الباب الخامس

تقانة الخلايا الجذعية

Stem Cells Technology

❖ **الفصل الأول**

أنواع الخلايا الجذعية وطرق عزلها

Stem Cells Types and Isolation

❖ **الفصل الثاني**

Stem cells Applications تطبيقات الخلايا الجذعية

الفصل الأول

أنواع الخلايا الجذعية وطرق عزلها

Stem Cells Types and Isolation

مقدمة

الخلايا الجذعية: هي خلايا غير متمايزة قادرة على التطور إلى خلايا متمايزة تشكل أنماطاً مختلفة من النسج التي يتكون منها الكائن الحي. عند الحديث عن الخلايا الجذعية هناك صفتان هامتان تميزان بين الأنواع المختلفة للخلايا الجذعية هما اللدونة وتعدد القدرة.

اللدونة plasticity: يقصد بها قدرة الخلية الجذعية على التمايز إلى أنواع خلوية مختلفة ضمن نسيج واحد. فمثلاً الخلايا الجذعية المعزولة من الأنبوب العصبي للجنين إذا زرعت في نسيجٍ عصبي فيمكنها التمايز إلى ثلاثة أنواعٍ من الخلايا العصبية هي: الخلايا الدبقية glial cells والخلايا النجمية astrocytes والعصبونات neurons.

تعدد القدرة multipotency: يقصد بها قدرة الخلية الجذعية على التمايز لإعطاء أنواعٍ عدة من النسج المكونة لعضوٍ ما. فمثلاً الخلايا الجذعية المعزولة من دماغ جنينٍ إذا زرعت في إحدى العضلات فيمكنها التمايز إلى كل أنواع النسج المكونة للعضلة.

وعموماً تصنف الخلايا الجذعية تبعاً لمصدرها إلى ثلاثة أنواعٍ رئيسةٍ:

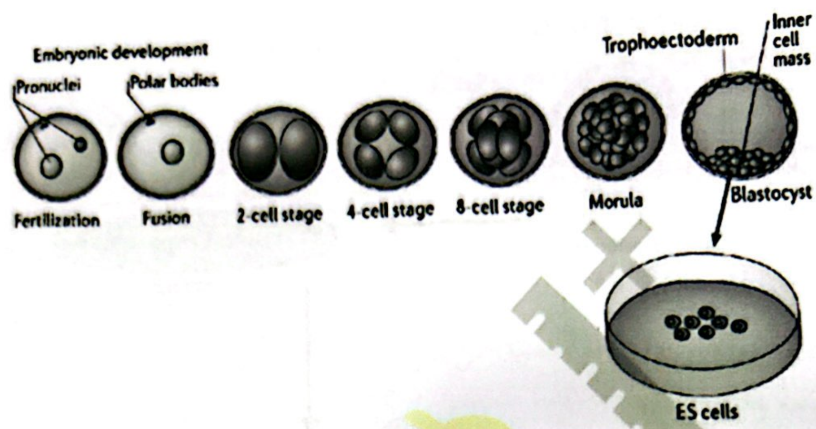
1- الخلايا الجذعية المضغية embryonic stem cells (ESCs) وتعزل من مرحلة المضغة.

2- الخلايا الجذعية الجنينية fetal stem cells (FSCs) وتعزل من الجنين fetus أو ملحقاته كالحبل السري umbilical cord والمشيمة placenta .

3- الخلايا الجذعية الجسمية adult stem cells (ASCs) وتعزل من نسج الكائن البالغ.

أولاً- الخلايا الجذعية المضغية embryonic stem cells

تبدأ البيضة الملقحة zygote بعد تشكلها بالانقسام (الشكل 5-1) لتعطي خلال 2-3 أيام كتلةً من الخلايا المتماثلة تسمى بالتويتة morula والتي تتحول في اليوم الخامس أو السادس إلى ما يشبه الكرة المجوفة والتي تسمى بالكيسة الأرومية blastocyst.



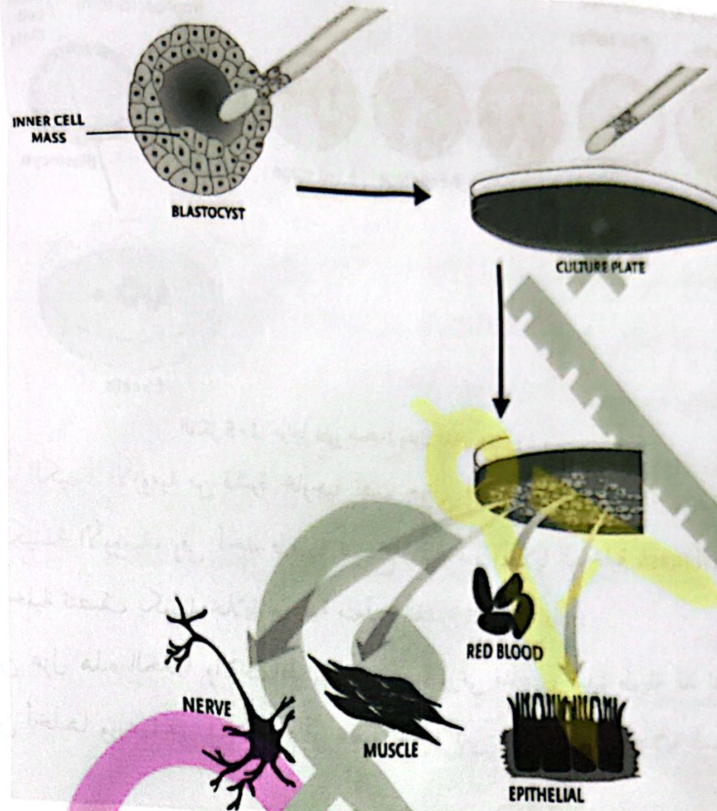
الشكل 5-1: مراحل تطور المضغة وعزل الخلايا الجذعية المضغية ESCs.

تتكون الكيسة الأرومية من قشرة خارجية تضم حوالي 70 خلية، ويوجد بداخلها فراغ يشغل جزءاً كبيراً من حجم الكيسة الأرومية، وفي أحد طرفيها تتوضع كتلة من الخلايا الداخلية inner cell mass مكونة من حوالي 30 خلية تتصف بكونها خلايا جذعية متعددة القدرة multipotent.

يمكن عزل هذه الخلايا والاحتفاظ بها في وسطٍ زرعي مناسبٍ لمدة طويلةٍ قد تصل إلى 3 سنوات، حيث يمكن أخذها وزرعها في أي نسيج أو عضو لتتمايز إلى مختلف أنواع الخلايا المكونة لهذا النسيج أو العضو.

عزل الخلايا الجذعية المضغية وحفظها من دون تمايز:

تعزل الخلايا الجذعية المضغية بشكلٍ مباشرٍ من خلايا الكتلة الداخلية inner cell mass للكيسة الأرومية، حيث تؤخذ هذه الخلايا وتنمى على أطباقٍ خاصةٍ تضمن الحفاظ عليها بشكلٍ غير متمايزٍ لحين الحاجة إليها، عندئذٍ يمكن نقل هذه الخلايا وزرعها في عضو ما لتبدأ بالتمايز إلى مختلف أنواع الخلايا المكونة لذلك النسيج أو العضو (الشكل 5-2).

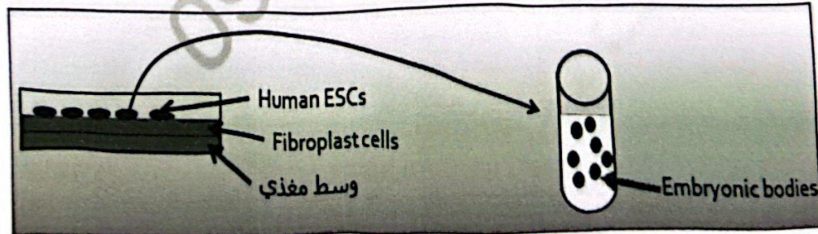


الشكل 5-2: عزل الخلايا الجذعية المضغية من الكيسة الأرومية.

أول عملية عزلٍ لخلايا جذعيةٍ مضغيةٍ تمت في العام 1981 من كيسة أرومية لجنين فأري، أما على صعيد البشر فتمت أول عملية عزلٍ في العام 1998 في الولايات المتحدة، وقد أثار ذلك جدلاً أخلاقياً وقانونياً لأن عملية العزل تؤدي إلى إتلاف المضغة والتي كان من الممكن -لو تركت- أن تتطور إلى جنينٍ كاملٍ.

لحفظ الخلايا الجذعية المضغية من دون تمايز تزرع على أطباق خاصة تحوي وسطاً مغذياً زرع على سطحه طبقةٌ رقيقةٌ من خلايا الأرومات الليفية الفأرية، حيث تلعب هذه الطبقة دوراً مغذياً feeder cells للخلايا الجذعية التي تزرع أعلى منها، إذ تنتج طبقة الخلايا المغذية باستمرارٍ عوامل نموٍ وانقسامٍ تؤثر في الخلايا الجذعية وتجعلها تبقى غير متمايزةٍ لحين الطلب (الشكل 5-3).

عند نقل الخلايا الجذعية المضغية من هذه الأطباق وزرعها في وسط مغذٍ سائلٍ من دون وجود الخلايا المغذية، تبدأ بالانقسام والتكاثر لتعطي معلقاً من كتل خلويةٍ تسمى الجسيمات المضغية embryonic bodies، ويمكن لهذه الجسيمات فيما لو تركت تتطور أن تعطي أنماطاً خلويةً عدةً بشكل مشابه لما هو موجودٌ في الوريقات الجنينية الثلاث.



الشكل 5-3: حفظ الخلايا الجذعية دون تمايز أو دفعها للتمايز عند الحاجة

ثانياً- الخلايا الجذعية الجنينية fetal stem cells

تعزل الخلايا الجذعية الجنينية من الجنين (بعد تعشيش المضغة في الرحم) أو أحد ملحقاته كالحبل الشوكي والمشيمة وفيما يلي بعض أنواع الخلايا الجذعية الجنينية التي نجح الباحثون بعزلها:

1- خلايا جذعية عصبية neural stem cells: توجد في الأنبوب العصبي للجنين وهي قادرة على التمايز لإعطاء مختلف أنواع الخلايا المكونة للنسيج العصبي، أو تهاجر بشكل طبيعي إلى مناطق أخرى من الجسم وتتمايز فيها إلى خلايا غير عصبية: من مثل الخلايا الصباغية، أو خلايا الغدد الهرمونية، أو خلايا غضاريف الوجه والجمجمة.

نجح الباحثون في بعض التجارب السريرية بعزل هذا النوع من الخلايا الجذعية وزرعها في أدمغة فئرانٍ تعاني من داء باركنسون، فتكاثرت هذه الخلايا وتمايزت إلى خلايا عصبيةٍ وظيفيةٍ وتراجعت حدة المرض عند هذه الفئران. لكن لا تزال هذه الدراسات في بداياتها كما أنها اقتصرت على الحيوان.

2- خلايا مولدة للدم hematopoietic stem cells: توجد في أعضاء الجنين المولدة للدم كالكبد والطحال كما يعد الحبل السري والمشيمة غنيان بهذا النمط من الخلايا الجذعية.

3- خلايا جذعية بانكرياسية pancreatic stem cells: تعزل من بانكرياس الجنين. في إحدى التجارب تم نقل هذا النمط من الخلايا وزرعها في بانكرياس فئران مصابة بالداء السكري، فلوحظ تحسن ملحوظ في حال الفئران.

عزل خلايا جذعية جنينية FSCs من المشيمة:

تعد المشيمة غنية بالخلايا الجذعية ولاسيما المولدة للدم hematopoietic stem cells، ويمكن عزل تلك الخلايا من مشيمة الطفل المولود حديثاً وحفظها له في بنوكٍ خاصةٍ، فمن الممكن أن يستفيد منها هذا الشخص لاحقاً خلال حياته لعلاج بعض الأمراض التي قد تصيبه أو لزراعة عضوٍ ما له في حال تلفه.

يتم عزل الخلايا الجذعية المولدة للدم من المشيمة وفقاً للمراحل الآتية (الشكل 5-4):

- يُفصل غشاء الأمنيون، وهو غشاء مصلي رقيق يغلف المشيمة، ويوضع في طبق بتري يحوي وسط زرعي أضيفت له إنزيمات بروتياز (كالتربسين).
- يحضن الطبق في درجة حرارة الغرفة لمدة زمنية تكفي لتفريق الخلايا المكونة للأمنيون من دون تخريبها.
- ينقل المعلق الخلوي الناتج إلى أنبوب تثفيل وتثفل العينة حتى ترسب الخلايا في قعر الأنبوب.
- تؤخذ رسابة الخلايا ويضاف إليها واسم نوعي للخلايا الجذعية المولدة للدم (ممكن ضد موسوم).
- تمرر الخلايا في جهاز مقياس الجريان الخلوي flow cytometry، حيث يتم عزل فقط الخلايا الجذعية الدموية وعدّها.

- تحفظ الخلايا المعزولة في الآزوت السائل لحين الحاجة إليها.

ثالثاً- الخلايا الجذعية الجسمية adult stem cells

يحوي جسم الكائن البالغ أيضاً كميات قليلة من الخلايا الجذعية غير المتمايزة وتتواجد خصوصاً في أعضاء مثل: نقي العظم، الجلد، العضلات، العين، الكبد، الدماغ.



الشكل 5-4: مراحل عزل الخلايا الجذعية من المشيمة وحفظها.

مهمة هذه الخلايا ترميم الضرر الحاصل في تلك النسج، فعندما يحدث ضرر ما في النسيج نتيجة لإصابة أو إنتان ما، تبدأ هذه الخلايا بالهجرة إلى مكان الإصابة والتمايز إلى أنواع الخلايا المكونة للنسيج الذي تعرض للضرر.

بالإضافة إلى ما سبق تقوم الخلايا الجذعية الجسمية بالانقسام لتعويض النقص الحاصل فيها self-renewal نتيجة لتمايز جزء منها، بحيث يبقى لدى الكائن مخزون من الخلايا الجذعية يكفيه طيلة حياته.

وتتميز هذه الخلايا في مجملها بصفة باللدونة plasticity وجزء قليل منها متعدد القدرة multipotent، إذ يمكن لخلايا جذعية معزولة من النقي أن تتمايز إلى خلايا عصبية ويمكن لخلايا جذعية معزولة من الدماغ أن تتمايز إلى خلايا عضلية أو دموية.

توجد صعوبة في التعامل مع الخلايا الجذعية الجسمية ويعود ذلك إلى الأسباب الآتية:

1- تعد هذه الخلايا نادرة ولا توجد في كل أعضاء الجسم، وإن وجدت في نسيج ما فإن أعدادها تكون قليلة.

2- يصعب الكشف عن وجودها كما يصعب تشخيصها وعزلها.

3- هناك صعوبة كبيرة في الحفاظ عليها خارج الكائن الحي (على أوساط زرعية) من غير أن تبدأ في التمايز، لذا كان من الصعب استعمالها في تطبيقات الطب الترميمي regenerative medicine.

تمييز الخلايا الجذعية الجسمية وعزلها:

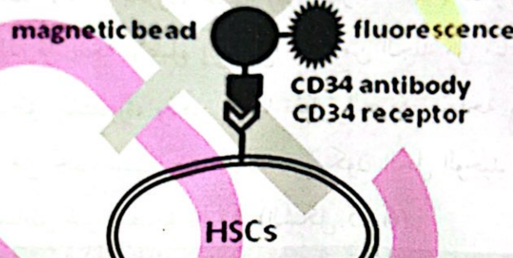
يمتلك كل نمط من الخلايا مصفوفة معينة من البروتينات السطحية surface protein array تميزه عن باقي الأنماط الخلوية، ويستعمل العلماء هذه البروتينات السطحية كبطاقة تعريف جزيئية molecular ID لتشخيص الخلايا وعزلها.

مثلاً للكشف عن الخلايا الجذعية الدموية HSCs وعزلها من عينة نقي العظم، يستعمل معقد مكون من: حبيبات مغناطيسية دقيقة magnetic beads ثبتت عليها أضداد للمستقبل CD34، وهو بروتين يوجد على أسطح الخلايا الجذعية الدموية. بالإضافة إلى ذلك وسمت الحبيبات المغناطيسية بمادة مفلورة (الشكل 5-5).

يحضر معلق من عينة نقي العظم ويضاف إليه المعقد السابق، حيث يرتبط المعقد على الخلايا الجذعية الدموية من دون باقي خلايا النقي.

يمكن باستعمال المجهر المفلور للكشف عن أماكن وجود الخلايا الجذعية في لطاخة من نقي العظم.

لعزل الخلايا الجذعية يعرض المعلق الخلوي إلى حقل مغناطيسي فيقوم بسحب الخلايا الجذعية المرتبطة بالحبيبات المغناطيسية وبذلك يمكن فصلها واستعمالها في تطبيقات الطب الترميمي.



الشكل 5-5: مبدأ كشف وعزل الخلايا الجذعية الدموية من عينة نقي العظم.

الفصل الثاني
تطبيقات الخلايا الجذعية
Stem cells Applications

أولاً- استعمال الخلايا الجذعية في الطب الترميمي Regenerative medicine

لم يتم حتى الآن إنتاج عضو كامل حيواني أو بشري في الوسط الزجاجي ولكن يبقى هذا هو الهدف الأساس لأبحاث الخلايا الجذعية وهو على الأقل ممكن من الناحية النظرية.

تركز الأبحاث حالياً على محاولة فهم آليات تمايز/عدم تمايز الخلايا الجذعية، وفي حال تمكن العلماء من فهم هذه الآليات، عندها سيكون الطريق ممهداً أمام تنمية أعضاء كاملة في الوسط الزجاجي.

لحل هذه المشكلة يعمل العلماء حالياً على مستويين:

1- دراسة التغيرات في التعبير الجيني التي تطرأ على الخلايا الجذعية في أثناء تمايزها إلى خلايا متخصصة، أي معرفة المورثات التي يشارك تفعيلها up regulation أو تثبيطها down regulation في عملية التمايز.

2- دراسة الوسائط الكيميائية (هرمونات، عوامل نمو....وغيرها) الموجودة في وسط الخلايا والتي قد تدفعها إلى الهجرة إلى النسج المتضررة والاندماج فيه والتمايز إلى خلايا وظيفية لإصلاح الضرر الحاصل.

وتوجد حالتان تم فيهما تحقيق تقدم حقيقي فيما يتعلق بتمايز الخلايا الجذعية إلى نسج وظيفية:

1- عزل خلايا جذعية مولدة للدم من نقي العظم و زرعها لمرضى زرع النقي، حيث أمكنها التمايز إلى نقي وظيفي قادر على توليد كل مكونات الدم من كريات بيض وحمر وصفيحات.

2- عزل خلايا جذعية من طبقات الجلد العميقة وجعلها تتمايز في المختبر في أوساط زرعية خاصة إلى نسيج جلدي وظيفي، من أجل زرعه للمصابين بحروق واسعة. ومن المعروف أن الجلد يحوي كميات لا بأس بها من الخلايا الجذعية بهدف تعويض الخلايا التي تتوسف أو تتعرض للتلف بسبب الجروح أو الحروق أو غيرها من الإصابات. عند الإصابة بحروق عميقة (من الدرجة الثالثة) تتخرب تلك الخلايا ويفقد الجلد قدرته على ترميم ذاته، لذا قد يلجأ الأطباء إلى نقل أجزاء من الجلد من مناطق سليمة غير ظاهرة (طعوم جلدية) وزرعها في المناطق المتضررة، ولكن عندما تغطي الحروق مساحة واسعة من سطح الجلد، فلن يجد الطبيب ما يكفي من جلد سليم لنقله، وعندها سيكون الحل الوحيد هو اللجوء إلى عزل الخلايا الجذعية الجلدية من المناطق غير المصابة بالحرق (الشكل 5-6).



الشكل 5-6: زراعة خلايا جذعية جلدية و تمايزها في الوسط الزجاجي.

ثانياً- دراسة بعض الأمراض و تطوير أدوية لها

يمكن باستعمال تقنية الخلايا الجذعية إنتاج حيوانات تجربة (فئران مثلاً) تمثل أنموذجاً مرضياً disease model لتجريب أدوية عليه. كما في حال إنتاج الفئران الورمية onco mice وهي فئران مصابة بورم سرطاني محدد تستعمل لتجريب علاجات لذلك السرطان عليها. لإنتاجها تعزل خلايا جذعية من الكيسة الأرومية لجنين الفأر، ثم تعدل وراثياً بإدخال مورثة مسؤولة عن تطور سرطان معين إليها oncogene، وبعد اصطفاء

الخلايا الجذعية التي نجحت في التقاط تلك المورثة، تعاد ثانية إلى الكيسة الأرومية للفأر أو تنقل نواتها إلى بويضة أنثوية فأرية غير ملقحة (تقنية نقل نواة الخلية الجسمية somatic cell nuclear transfer) وتترك في الزجاج حتى تتطور ثانية إلى مضغة كاملة تزرع في رحم أنثى فأر، لتعطي فأراً مصاباً بالسرطان المراد دراسته واختبار أدوية مضادة له.

تقنية نقل نواة الخلية الجسمية Somatic cell nuclear transfer (SCNT):

تستعمل هذه التقنية لإنتاج الحيوانات المستنسخة (كما في حال النعجة دوللي)، حيث تؤخذ إحدى الخلايا الجسمية (جلد، عضلات، بطانة الفم) من الكائن المراد استنساخه ثم تستأصل نواتها (ثنائية الصيغة الصبغية 2n) باستعمال جهاز Micromanipulator، وتزرع هذه النواة الجسمية في بويضة أنثوية (1n) لكائن من النوع ذاته – تم مسبقاً إزالة نواتها– وتترك هذه البيضة (التي تعد الآن بمنزلة بيضة ملقحة 2n) لتنقسم عدة مرات في الزجاج ثم تزرع في رحم أنثى لكائن من النوع نفسه حيث تتطور لتعطي كائناً حياً مستنسخاً clonal baby مطابقاً من الناحية الوراثية للكائن الذي أخذت منه النواة الجسمية (الشكل 5-7).



الشكل: 5-7: إنتاج أجنة مستنسخة باستعمال تقنية نقل نواة الخلية الجسمية SCNT.

ثالثاً- استنساخ حيوانات معدلة وراثياً تنتج بروتيناً أو مادةً دوائيةً

تعزل إحدى الخلايا الجسمية من إحدى حيوانات التربية كالأغنام وتعدل وراثياً بإدخال مورثة ترمز اصطناع بروتين ذو قيمة علاجية (هرمون، إنزيم، عامل نمو.... وغيرها) أو مورثة ترمز ناتج استقلاب أو مادة كيميائية دوائية. ثم تنقل نواة هذه الخلية المعدلة وراثياً إلى بويضة أنثوية غير ملقحة لحيوان من النوع نفسه باستعمال التقنية السابقة الذكر SCNT.

ينتج عن ذلك حيوان معدل وراثياً يحوي في لحمه أو يفرز في حليبه البروتين أو المادة العلاجية، حيث يمكن إعطاء الحليب مباشرة للمريض أو عزل المادة الفعالة على نطاق واسع من لحم الحيوان أو حليبه.



الشكل 5-8: حليب كامل الدسم من أبقار مستنسخة مخبرياً.

العقبات التي تواجه أبحاث الخلايا الجذعية

هناك مجموعة من المعوقات التي تواجهها أبحاث الخلايا الجذعية على المستوى العالمي أهمها:

1- مشكلات تقنية:

وهي كثيرة وإحداها هي اعتماد زراعة الخلايا الجذعية على وجود طبقةٍ من الخلايا المغذية feeder cells مما يحد كثيراً من زرع ومكاثرة الخلايا الجذعية على نطاقٍ صناعيٍ كبيرٍ.

2-عقبات قانونية و أخلاقية:

ما تزال تقنية الخلايا الجذعية (المضغية على وجه الخصوص) تثير جدلاً واسعاً بين رجال القانون والدين وحتى على الصعيدين الشعبي والسياسي، ويعود هذا الجدل إلى أن عزل الخلايا الجذعية المضغية يسبب قتل الكيسة الأرومية والتي كانت ستتطور إلى كائن حي فيما لو تركت تنمو.

3-ضعف التمويل:

بعكس أبحاث السرطان لا تحظى أبحاث الخلايا الجذعية بالدعم المالي الكافي الحكومي وحتى الشعبي (تبرعات المواطنين) ويعود ذلك إلى الجدل الذي يدور حول شرعية هذه التقنية، وتقتصر مصادر التمويل على مراكز الأبحاث الخاصة وشركات التقانة الحيوية المهتمة بهذه الأبحاث لأغراضٍ تجاريةٍ.

المخاطر الناتجة عن استعمال الخلايا الجذعية في الطب الترميمي

توجد حالياً مجموعة من المخاطر التي قد تنجم عن استعمال تقنية الخلايا الجذعية نوجزها بمايلي:

1- احتمال تشكل أورام عند المريض:

لوحظ في بعض التجارب على الفئران -التي نقلت إليها خلايا جذعية مضغية ESCs- ظهور تشكلات ورمية حميدة benign tumors، ويعود ذلك إلى كون هذا النوع من الخلايا متعدد القدرة، مما أدى إلى تمايزها إلى أنواع مختلفة من الخلايا وليس فقط إلى خلايا النسيج المطلوب والذي زرعت فيه هذه الخلايا الجذعية.

في تجارب أخرى سمح لهذه الخلايا الجذعية ببدء التمايز في الزجاج نحو النوع المطلوب من النسج، ثم تم نقلها إلى الفئران فتراجعت احتمالات تشكل تلك الأورام.

2- احتمال انتقال بعض العوامل الممرضة:

يمكن أن تنتقل إلى المرضى المعالجين بالخلايا الجذعية عوامل ممرضة خطيرة (جرثومية أو فيروسية) بسبب الاعتماد على خلايا مغذية فأرية، أو نتيجة لاستعمال خلايا جذعية مصدرها حيواني.

3- *الرفض المناعي* Immune rejection:

يحدث بالتأكيد رفضٌ مناعيٌ عند القيام بنقل خلايا جذعيةٍ من حيوانٍ إلى إنسانٍ أو من إنسانٍ إلى آخرٍ وهي مشكلةٌ موجودةٌ في زراعة الأعضاء transplantation ولكن يعتقد بأن نقل الخلايا الجذعية غير المتمايزة يولد رفضاً مناعياً أقل منه في حال زرع أعضاء كاملةٍ.

يسبب نقل بعض أنواع الخلايا الجذعية كالخلايا المتشعبة dendretic cells والخلايا المناعية رفضاً مناعياً أكبر منه في حال باقي أنواع الخلايا الأخرى، ويعود ذلك لكثرة المستضدات الموجودة على سطوحها والتي تحرض رداً مناعياً أكبر.

تقنيات للتغلب على الرفض المناعي للخلايا الجذعية المزروعة

1- تعديل أو حذف المستضدات السطحية:

تحوي الخلايا على أسطحها مستضدات هي عبارة عن بروتينات ذات تذييلات سكرية في الغالب (بروتينات سكرية)، يتعرف الجهاز المناعي على تلك المستضدات ويشكل أضداد لها.

يمكن تقليل الرد المناعي من خلال حذف بعض المورثات التي ترمز إنزيمات مسؤولة عن إضافة المستضدات على أسطح الخلايا، أحد تلك المورثات هي مورثة تدعى GGTA1 ترمز هذه المورثة إنزيم α-1,3-galactosyl transferase المسؤول عن إضافة تذييلات سكرية إلى بروتينات سطح الخلية، بحذف أو تعطيل هذه المورثة، تنتج خلايا لا تحوي أسطحها تذييلات سكرية، مما يقلل الرفض المناعي لها. استعملت هذه التقنية لإنتاج خنازير مؤنسنة لنقل أعضائها (صمامات القلب مثلاً) إلى البشر.

2- إنتاج خلايا جذعية مطابقة وراثياً لخلايا للمريض:

ففي حال مريض يعاني من تلف في الكبد وبحاجة لنقل خلايا جذعية له كي تتمايز إلى خلايا كبدية، يمكن أخذ عينة من خلايا جسمه ونقل نواتها إلى بويضة منزوعة النواة من متبرع أنثوي (تقنية نقل نواة الخلية الجسمية SCNT)، حيث توضع نواة خلية المريض الجسمية مكان نواة البويضة وتترك حتى تنقسم وتتطور إلى كيسة أرومية عندها يمكن عزل خلايا جذعية مضغية منها تكون مطابقة وراثياً بشكل تام للمريض، حيث يمكن زرعها له من دون أن يرفضها جسمه.

مقارنة بين تقنيات عزل الخلايا الجذعية

الجدول 5-1: مقارنة بين تقنيات عزل الخلايا الجذعية

طريقة عزل الخلايا الجذعية	من الكيسة الارومية	نقل نواة الخلية الجسمية	الخلايا الجذعية الجسمية

ميزات الخلايا المعزولة	- تتمايز لخلايا مختلفة - سهلة الكشف،العزل، الزرع	- تتمايز لخلايا مختلفة - سهلة الكشف،العزل، الزرع - يمكن إنتاج خلايا مطابقة وراثياً للمريض	- أظهرت نجاحاً في بعض العلاجات -يمكن إنتاج خلايا مطابقة وراثياً للمريض
مساوئ التقنية	- الدعم الحكومي الضعيف لها - مخاطر تشكل أورام Teratomas	- مخاطر تشكل أورام Teratomas	-الحصول على عدد محدود من الخلايا - لا توجد الخلايا في كل النسج -صعبة الكشف، العزل، الزرع
الاعتبارات الأخلاقية والقانونية	- تؤدي إلى قتل الكيسة الأرومية -جدل حول مشروعية التبرع بالخلايا الجنسية	- تؤدي إلى قتل الكيسة الأرومية -جدل حول مشروعية التبرع بالخلايا الجنسية - هناك مخاوف من إساءة الاستعمال	- لا توجد محاذير قانونية أو أخلاقية

الباب السادس

إنتاج البروتينات المأشوبة

Production of Recombinant Proteins

❖ الفصل الأول

إنتاج البروتينات المأشوبة باستعمال أنظمة طلائعيات النوى

Recombinant Proteins Production in Prokaryotic Systems

❖ الفصل الثاني

إنتاج البروتينات المأشوبة باستعمال أنظمة حقيقيات النوى

Recombinant Proteins Production in Eukaryotic Systems

الفصل الأول

إنتاج البروتينات المأشوبة باستعمال أنظمة طلائعيات النوى

Recombinant Proteins Production in Prokaryotic Systems

مقدمة

تلعب البروتينات دوراً محورياً في التطبيقات الطبية والصيدلية، ففي التشخيص المخبري لا يمكن الاستغناء عن الإنزيمات في معظم المعايرات الحيوية، وتعد الكثير من البروتينات بمنزلة مادة فعالة علاجياً في بعض المستحضرات الدوائية (كالهرمونات الببتيدية)، وتشارك أيضاً في كثير من العمليات التحويلية في صناعة المواد الفعالة، وتملك دوراً مهماً في الصناعات الغذائية وصناعة مواد التنظيف.

أسباب استعمال التأشيب لإنتاج البروتينات:

يمكن الحصول على البروتينات بتقنيات الاستخلاص من الكائنات الحية ولكن تبقى هناك مشكلة درجة النقاوة العالية (>99%) اللازمة لمعظم التطبيقات الطبية والعلاجية، لذلك يوفر التأشيب وسيلةً للحصول على البروتينات بكمياتٍ كبيرةٍ ونقاوةٍ عاليةٍ ويعد ذلك ضرورياً للأسباب الآتية:

1- سهولة بلورة البروتينات، حيث تكون فقط البروتينات فائقة النقاوة قابلةً للبلورة.

2- لدراسة البنية ثلاثية الأبعاد لبروتينٍ جديدٍ باستعمال الأشعة السينية (x-ray) لابد من أن يكون نقياً.

3- عند استعمال الهرمونات أو الإنزيمات في المعالجة فلا يجوز أن تحوي على أية شوائب ولو كانت بنسبةٍ ضئيلةٍ، لاسيما في الأشكال الحقنية.

متطلبات إنتاج البروتينات المأشوبة في الكائنات الحية

لإنتاج البروتينات المأشوبة في خلايا الكائنات الحية بشكل مجدٍ اقتصادياً لابد من توافر المتطلبات الآتية:

1- ضمان الوصول إلى أقصى مردودٍ للإنتاج من خلال تعبيرٍ عالٍ للبروتين المستهدف target protein من دون باقي بروتينات الخلية المضيفة host cell، ويتحقق ذلك من خلال:

أ- اختيار مُحرّضٍ قويٍ promoter يؤمن مستوى عالٍ لعمليات الانتساخ أي تشكيل عدد كبير من نسخ الرنا المرسال mRNA لمورثة البروتين المستهدف.

ب- وجود نسخٍ متعددةٍ من مورثة البروتين المستهدف في خليةٍ واحدةٍ من خلايا العائل، ويمكن تحقيق ذلك بتحميل المورثة على ناقل vector يمتلك عدداً مرتفعاً من النسخ high copy number.

2- ضرورة أن يكون البروتين المنتج غير سامٍ للخلايا التي ستنتجه.

3- ضرورة أن يكون البروتين المنتج منحلاً في الوسط الحيوي لكي يكون ذا فعالية علاجية ولكي نتمكن لاحقاً من عزله وتنقيته.

4- وجود طريقةٍ فعالةٍ لعزل البروتين المطلوب، لأن الخلية المضيفة ستنتج مئاتٍ من البروتينات الأخرى خلال دورة حياتها، ومن ثم يجب إيجاد طريقةٍ لإيجاد البروتين المطلوب وفصله بشكلٍ نقيٍ عن باقي مكونات الخلية.

أهم المحرّضات المستعملة للتعبير الجيني في أنظمة طلائعيات النوى:

تكمن أهمية المحرّض المستعمل في أنه يحدد شدة التعبير الجيني لمورثة البروتين المطلوب وبالنتيجة مردود اصطناع البروتين في الخلية، كما أنه يحدد إمكانية بدء وإيقاف الإنتاج في اللحظة التي نريدها، لما لذلك من أهمية كبيرة سيأتي تفصيلها لاحقاً.

أولاً- محرّض استقلاب اللاكتوز Lac promoter:

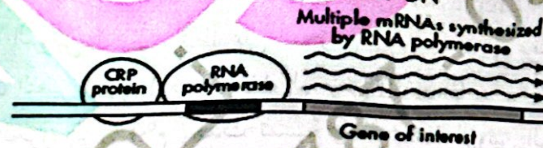
يعد الغلوكوز المصدر الأساس للطاقة لجراثيم الإشريكية القولونية *E.coli*، وفي حال غياب الغلوكوز وتوافر اللاكتوز في الوسط يتفعل محرض استقلاب اللاكتوز Lac promoter، مما يؤدي إلى إنتاج الإنزيمات المسؤولة عن شطر اللاكتوز وتحويله إلى سكاكر أحادية (غلوكوز وغالاكتوز) تقدر الجراثيم على استعمالها كمصدر للطاقة.

آلية عمل محرّض استقلاب اللاكتوز lac promotor

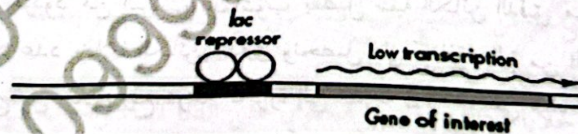
يتحكم في آلية عمل محرّض استقلاب اللاكتوز نوعان من البروتينات كما هو مبين في الشكل 6-1.

(a) The *lac* promoter

(i) Glucose absent, IPTG present: promoter ON



(ii) Glucose present, IPTG absent: promoter WEAKLY ON



الشكل 6-1: آلية عمل وتنظيم محرّض استقلاب اللاكتوز lac promoter.

البروتين الأول: بروتينٌ منشطٌ للانتساخ activator يدعى CRP يتحد مع الرنا بوليميراز *RNA polymerase* ويفعله لبدء الانتساخ.

البروتين الثاني: بروتين مثبط lac repressor يرتبط على المحرِّض ويمنع بدء عملية الانتساخ، يتأثر هذا البروتين المثبط بوجود اللاكتوز أو مشابهاته الصنعية مثل IPTG (isopropyl thio glycol)، إذ تعمل بمنزلة جزيئة إشارة signal molecule تتحد معه وتفصله عن المحرِّض مما يؤدي إلى انتهاء أثره المثبط.

يؤدي وجود الغلوكوز في الوسط وغياب اللاكتوز إلى تثبيط اصطناع بروتين CRP -بآلية مستقلة- وارتباط البروتين lac repressor على المحرض مما يؤدي إلى توقف الانتساخ.

أما عند غياب الغلوكوز وتوافر اللاكتوز أو أحد مشابهاته الصنعية كال IPTG فيحدث إنتاج للبروتين المنشط CRP وانفكاك للبروتين المثبط عن مكان ارتباطه على المحرِّض فتبدأ عملية الانتساخ ثم الترجمة وتنتج الخلية الإنزيمات الضرورية لاستقلاب اللاكتوز.

تستعمل في التجارب المخبرية عادة مادة IPTG في تحريض induction بدء انتساخ المورثات الموضوعة تحت إشراف المحرِّض lac promoter.

ثانياً- المحرِّض لمدا λ promotor

عزل هذا المحرِّض من ملتهمات الجراثيم من النمط لمدا λ-bacteriophage. عندما يهاجم هذا الفيروس خلية جرثومية فإنه يتثبت على سطح الخلية بوساطة مستقبلات محددةٍ ثم يقوم بحقن مادته الوراثية داخل الخلية، إذ تكون المورثات المحقونة موضوعة تحت إشراف وتحكم المحرِّض لمدا.

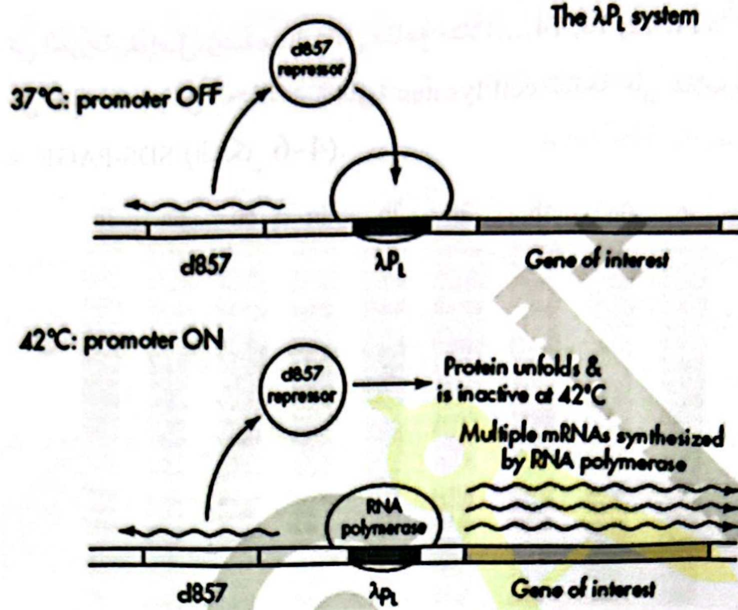
يترافق الإنتان الفيروسي عادةً بارتفاع في درجة حرارة جسم الكائن، وتستعمل الفيروسات هذه الحقيقة لتحريض انتساخ مورثاتها، إذ أن بعض المحرِّضات الفيروسية مثل لمدا مصممة لتبدأ بالانتساخ عند ارتفاع درجة الحرارة، ويوضح الشكل 6-2 آلية عمل وتنظيم المحرِّض لمدا.

يتحكم بعمل هذا المحرِّض بروتينٌ مثبطٌ للانتساخ يسمى d857 repressor، ففي درجة الحرارة الفيزيولوجية (37°م) يكون البروتين المثبط مرتبطاً على المحرِّض، مما يؤدي إلى عرقلة ارتباط إنزيم الانتساخ RNA polymerase وتوقف التعبير الجيني (وضعية إطفاء المحرِّض turn off).

وعندما ترتفع درجة الحرارة إلى 42°م يحدث تمسيخٌ denaturing للبروتين المثبط d857 repressor لأنه حساسٌ لدرجات الحرارة المرتفعة، مما يؤدي إلى انفكاكه عن المحرِّض وإفساح المجال لإنزيم الانتساخ ليبدأ عمله (وضعية تشغيل المحرِّض turn on).

الفائدة التطبيقية للمحرِّض لمدا

للحصول على أكبر مردودٍ من البروتين المأشوب يفضل تنمية الكائن الدقيق من دون أن نبدأ عملية التعبير الجيني، بحيث يزداد عدد خلايا الكائن الدقيق ونحصل على كثافةٍ عاليةٍ من الخلايا، ثم وفي الوقت المناسب يتم تحريض الإنتاج من خلال رفع درجة الحرارة إلى الدرجة 42°م، ففي هذه الدرجة يتفعل المحرِّض ويبدأ إنتاج البروتين، في حين تصبح الشروط غير مثاليةٍ لتكاثر الكائن الدقيق، وبذلك تذهب معظم موارد وسط النمو لصالح إنتاج البروتين المأشوب بشكل انتقائي.



الشكل 6-2: آلية عمل وتنظيم المحرّض الحراري λ.

استعراض تعبير البروتينات Monitoring of protein expression:

يعد مردود إنتاج البروتين المأشوب من أهم الأوليات ولاسيما على المستوى الصناعي، فكلما زاد المردود كلما انخفضت تكلفة المنتج وسعره بالنسبة للمستهلك، إضافة إلى زيادة قدرة الشركة المنتجة على المنافسة. لذا كان من الضروري إيجاد طرقٍ لتحديد الشروط المثلى لإنتاج البروتين المأشوب في الخلايا المضيفة.

وتعتمد هذه الطرق على اختبار مختلف المتغيرات parameters التي تؤثر على مردود الإنتاج وهي كثيرة ومنها: نوع الخلايا المضيفة (طلائعيات/حقيقيات النوى)، نوعية أوساط الزرع، درجة حرارة الحضن، سرعة التحريك، كثافة الخلايا optical density (OD) عند بدء تحريض الإنتاج، تركيز المادة المحرضة inducer، مدة الحضن بوجود المادة المحرضة....إلخ.

بعد دراسة كل واحد من هذه المتغيرات، تحدد الشروط المثلى التي تكون عندها الخلايا المضيفة قادرة على إنتاج أكبر مردود من البروتين المأشوب.

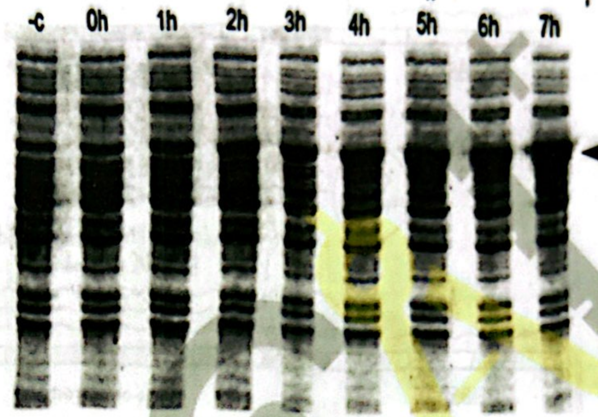
تجرى هذه الدراسات عادة على نطاق مخبري، ثم يعاد التحقق منها على نطاق صناعي واسع large scale.

لدراسة تأثير واحدٍ من المتغيرات السابقة، مثل مدة الحضن بعد إضافة المادة المحرضة للتعبير الجيني (مثل IPTG)، نقوم بما يلي:

- تُحضَّر مزرعة من خلايا الكائن المضيف الحاوي على الدنا المأشوبة وتحضن حتى الوصول إلى كثافة نموٍ مناسبةٍ.
- تحرض عملية اصطناع البروتين المأشوب بإضافة المادة المحرضة للتعبير الجيني، ونعد لحظة إضافة المادة المحرضة بمنزلة نقطة البدء T_0.

- تقتطع عينات من المزرعة بفواصل زمنية منتظمةٍ كل ساعةٍ مثلاً:....T1, T2, T3, T4.

- تحل الخلايا من كل عينة وترحل الحلالات الخلوية cell lysates الناتجة على هلامة البولي أكريل أميد في شروط ممسخة SDS-PAGE (الشكل 6-4).



الشكل 6-4: صورة الرحلان على هلامة SDS-PAGE لعيناتٍ جرى تحريض التعبير الجيني فيها لمددٍ زمنيةٍ مختلفةٍ. نلاحظ من الصورة وجود عصابة (أشير إليها بسهم) تزداد ثخانتها مع ازدياد مدة الحضن، تمثل هذه العصابة البروتين المأشوب. أما c- فتمثل عينةً لم تضف إليها مادة التحريض وتعد بمنزلة شاهدٍ سلبي. في هذا المثال نلاحظ أن أكثر مردود من البروتين نحصل عليه بعد 7 ساعات من الحضن مع مادة الـ IPTG.

المشكلات التي تواجه إنتاج البروتينات المأشوبة

توجد الكثير من الصعوبات التي تعترض عملية إنتاج البروتينات المأشوبة، ويمكن إيجاز أهم هذه المشكلات كما يأتي:

1- قد يكون البروتين المأشوب سام للخلايا المضيفة.

2- قلة مردود البروتين الناتج .

3- قد تكون كمية البروتين الناتج جيدة، لكنه غير ذواب مما يجعل من الصعب عزله ويؤثر على فعاليته.

يمكن معالجة كل مشكلة من المشكلات السابقة بالشكل المناسب كما يأتي.

أولاً- البروتين المأشوب سام للخلايا المضيفة.

إحدى أهم الميزات التي توفرها المحرّضات القابلة للتنظيم (تفعيل/تثبيط) هي إمكانية تنمية الخلايا الحاوية على مورثات تعبّر بروتيناتٍ سامةٍ من دون أن يتم إنتاج هذا البروتين، وعندما تصل الخلايا إلى كثافة نموٍ عاليةٍ نقوم بتفعيل المحرّض لمدة زمنيةٍ قصيرةٍ يتم خلالها اصطناع كميةٍ جيدةٍ من البروتين المأشوب (نظراً لكثرة عدد الخلايا) قبل أن تبدأ الخلايا بالتأذي والتوقف بالتالي عن الإنتاج.

أما لو تم تفعيل المحرّض من بداية زرع الخلايا، فإن عدد الخلايا المنتجة سيكون قليلاً وذلك لموتها قبل أن تصل إلى كثافةٍ جيدةٍ، وبالنتيجة سيكون مردود البروتين ضعيفاً.

ثانياً- قلة كمية البروتين المُعبَّر:

عندما تسير الأمور على ما يرام فإننا سنحصل على كمية كبيرة من البروتين المُعبَّر over expression، لكن أحيانا نشاهد في النهاية غلة yield قليلة من البروتين وذلك لأحد الأسباب الآتية:

1- أسباب تتعلق بتصميم الدنا المأشوب:

- ضعف المحرض: يقوم المحرض بربط إنزيم الرنا-بوليميراز لبدء الانتساخ، فإذا كان الارتباط ضعيفاً لضعف تعرف الرنا-بوليميراز على تسلسلات المحرض، عندها سيتأخر ارتباط الإنزيم على المحرض وسنحصل على تعبير ضعيف للبروتين المطلوب، والحل في هذه الحال هو أن نختار محرضاً آخر يكون قوياً ويستطيع ربط عدد كبير من إنزيمات الرنا- البوليميراز.

أ- الناقل يمتلك عدد نسخ قليل low copy number: يجب أن يتوافر في الخلية عدد كبير من نسخ الناقل 20-30 نسخة على الأقل، فإذا كانت كلها تعمل نحصل على كمية كبيرة من البروتين، أما لو كان عدد نسخ الناقل قليلاً low copy number فسنحصل على بروتين قليل، والحل في هذه الحال هو أن نغير الناقل.

ب- تسلسل التعرف على الريبوزوم Ribosomal binding site (RBS) غير نوعي، وهو تسلسل موجود على mRNA (غني بأسس آزوتية بورينية A,G) من خلال تسلسل الـ RBS يتعرف الريبوزوم على الرنا المرسال ويقوم بربطه لبدء الترجمة، فإذا كان هذا الموقع غير نوعي تكون عملية الارتباط غير جيدة وبالتالي تحدث إعاقة في مرحلة الترجمة ويكون الناتج قليل، أما الحل فهو باستبدال تسلسل الـRBS بآخر أكثر نوعية .

2- مشكلات في أثناء أو بعد الترجمة :

أ- المورثة مأخوذة من كائن يستعمل روامز نادرة rare codons : نعلم أن كل حمض أميني يمكن ترميزه بأكثر من رامزة، وقد تكون أحداها رامزة نادرة ترمز رنا ناقل نادر لا تستعمله خلايا العائل، وبالتالي يتأخر أو يتعذر وصول الرنا الناقل الحامل للحمض الأميني المطلوب إلى مكان الترجمة على الريبوزوم، وبالتالي تتأخر عملية الترجمة.

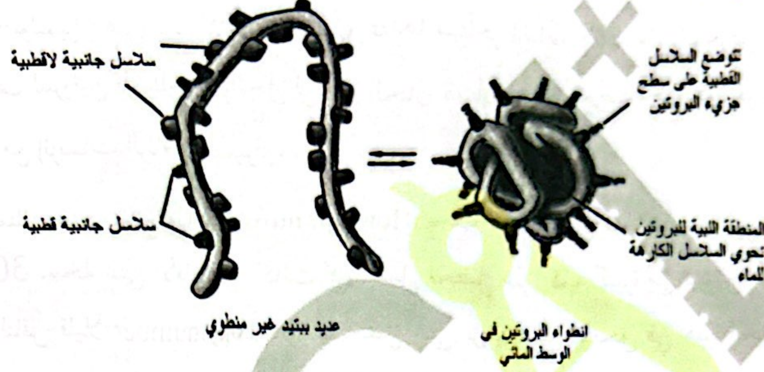
يكون الحل بتغيير ترميز المورثة بحيث تصبح ترمز نواقل متوافرة في الخلية common codons وهذا أمر صعب عملياً. الخيار الثاني هو استعمال خلايا عائل معدلة وراثياً بحيث تنتج كل أنواع الرنا الناقل tRNA.

ب- تدرك البروتين الناتج بعد اصطناعه مباشرةً بفعل بروتياز الخلية، ويكون الحل باستعمال سلالات *E. coli* أخرى معدلة وراثياً، بحيث يتم تعطيل المورثات التي ترمز البروتياز فيها، وهي متوافرة تجارياً، أو بحماية الطرف N-terminal من البروتين (إضافة N-terminal fusion) وبذلك يبقى غالباً بمنأى عن فعل البروتياز الخلوي.

ثالثاً- البروتين كافي لكنه غير حلول وبالتالي غير فعال وظيفياً:

في هذه الحال نشاهد على الرحلان للحلالة الخلوية عصابة ثخينة للبروتين، لكن لا يمكن تنقيته والسبب في هذه الحال هو فشل في عملية الانطواء الصحيح protein folding. إذ يكون البروتين بشكل

خطي في بداية اصطناعه، ثم ينطوي على نفسه ليأخذ شكلاً فراغياً محدداً تبعاً للوظيفة التي سيؤديها، ويحصل هذا الانطواء بفعل القوى الكارهة للماء hydrophobic reaction، حيث تنجذب الأجزاء الكارهة للماء إلى بعضها مشكلة نواة البروتين (في الداخل) في حين تتوضع الأجزاء المحبة للماء نحو الخارج (الشكل 6-5)، وبذلك نحصل على جزيئة قابلة للانحلال (التبعثر) في الماء فعالة وظيفياً ويمكن عزلها وتنقيتها.

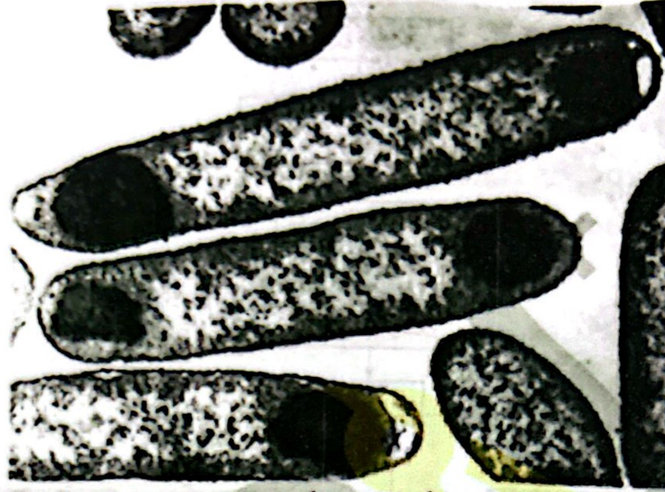


الشكل 6-5: انطواء البروتين بعد اصطناعه بتأثير القوة الكارهة للماء وصولاً إلى شكل ذواب وفعال.

قد يحدث أحياناً عندما يتم اصطناع البروتين بكميات هائلة من قبل العائل over expression أن تتجاذب السلاسل الكارهة للماء من عدة جزيئات بروتينية إلى بعضها وتتشابك بشكل خاطئ (الشكل 6-6)، وبالتالي تتراكم جزيئات البروتين وتترسب ضمن الخلية مشكلة كتل مترسبة كبيرة تعرف بالجسيمات الاشتمالية inclusion bodies وطبعاً يكون البروتين الناتج غير وظيفي (الشكل 6-7).



الشكل 6-6: تشابك جزيئات البروتين وفشلها في الانطواء الصحيح نتيجة لتركيزها العالي.



الشكل 6-7: صورة بالمجهر الإلكتروني توضح تشكل الجسيمات الاشتمالية في جراثيم E. coli

تحسين انحلالية البروتين:

يمكن اللجوء إلى أحد الحلول الآتية لحل مشكلة عدم انحلال البروتين الناتج:

1- عزل البروتين بشروط ممسخة denaturing conditions ثم إعادة انطوائه refolding. لتحقيق ذلك تحل الخلايا وتعزل الجسيمات الاشتمالية inclusion bodies، وتذاب في محلول عامل ممسخ قوي مثل اليوريا بتراكيز عالية، يمدد محلول البروتين الممسخ لتخفيف تركيزه، ثم يتم سحب العامل الممسخ بشكل تدريجي من الوسط من خلال إجراء تحال dialysis باستعمال أغشية نصف نفوذة، فيبدأ البروتين بالانطواء التدريجي على نفسه كلما انخفض تركيز العامل الممسخ (اليوريا).

من المفترض أن ينطوي البروتين على نفسه ثانية ليعطي الشكل الحلول والفعال، لكن هذه الطريقة ليست دائما ناجحة.

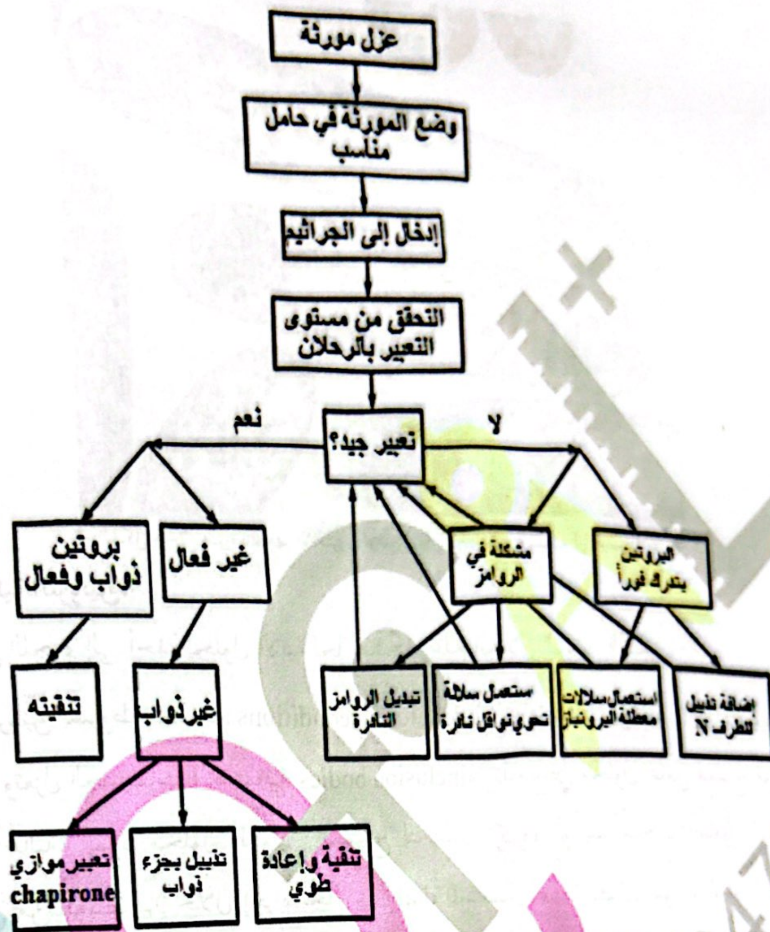
2- استعمال محرض أقل قوة.

3- استعمال بلاسميد يمتلك عدد نسخ قليل low copy numbers وبالتالي نحصل على كمية أقل من البروتين المعبر لكنه ينطوي بشكل صحيح.

4- جعل شروط النمو غير مثالية (حرارة منخفضة – وسط فقير بالمواد المغذية، ....إلخ) وبالتالي تنمو الخلايا بشكل أقل وتنتج بروتيناً أقل .

5- تعبير موازي لـ chaperons وهي بروتينات تساعد على الانطواء الصحيح للبروتين.

6- تذييل البروتين بجزء ذواب، يمكن أن يضاف إلى تسلسل البروتين تسلسلاً لجزيء كبير نسبياً وذواب، وبالنتيجة نحصل على بروتين مدمج fusion protein لكنه يكون منحلاً.



الشكل 6-8: كافة المشاكل التي نواجهها خلال إنتاج البروتينات مع الحلول الممكنة لكل حالة.

الفصل الثاني

إنتاج البروتينات المأشوبة باستعمال أنظمة حقيقيات النوى

Recombinant Proteins Production in Eukaryotic Systems

يعد إنتاج البروتينات المأشوبة في الجراثيم تقنية سهلة ورخيصة نسبياً (مقارنة مع خلايا حقيقيات النوى)، إلا أن للجراثيم محدوديات أهمها أنها غير قادرة على إنجاز عدد كبير من تعديلات ما بعد الترجمة التي تخضع لها بروتينات حقيقيات النوى، لغياب الجمل الإنزيمية اللازمة لتلك التعديلات لديها.

فكلما كان البروتين المطلوب ذا بنية أعقد (مثلاً: مكون من عدة وحدات أو له تذييلات إضافية) كلما كان إنتاجه في الجراثيم غير ممكن عملياً.

تعد إضافة زمر الغليكان على الطرف N للبروتين N-linked glycosylation من أهم تعديلات ما بعد الترجمة التي تخضع لها البروتينات، وتتم الإضافة عادة على ثمالات الحمض الأميني أسبارجنين.

تغير هذه التعديلات البروتين بشكل كبير من حيث:

- وزنه الجزيئي.
- انطواء سلسلة البروتين في الفراغ.
- فعالية البروتين.
- الرد المناعي من قبل الجسم.
- مدة بقاء البروتين في مجرى الدم.

نعلم أنه يتم اصطناع البروتين على الجسيمات الريبية (تتواجد في السيتوبلاسما عند طلائعيات النوى أما عند حقيقيات النوى فتوجد الجسيمات الريبية أيضاً على سطح الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية الخشنة) ER (. حيث يخرج mRNA من النواة ويتجه إلى سطح الشبكة السيتوبلاسمية الخشنة ليرتبط على الريبوزومات حيث يتم اصطناع البروتين وبعد انتهاء اصطناعه يدخل إلى تجاويف الشبكة السيتوبلاسمية، وهناك يخضع لتعديلات ما بعد الترجمة وتضاف له تذييلات، ثم يفرز البروتين المتشكل إلى السيتوبلاسما ليقوم بدوره إذا كان بروتين داخل خلوي، أما لو كان بروتين خارج خلوي فيتم إفرازه إلى خارج الخلية عن طريق حويصلات جهاز غولجي.

بالنظر إلى ما سبق يفضل أن يتم التعبير عن البروتينات في بيئة مشابهة لبيئة منشأها (مثلاً بروتينات ثدييات في خلايا ثدييات).

التعبير الجيني في خلايا الخمائر:

تعد خلايا خميرة الجعة *Sacchromyces cerevisiae* مثالاً مبسطاً عن حقيقيات النوى ويمكن استعمالها لتعبير بروتينات بشرية إذا كانت بنية هذه البروتينات بسيطة (مكونة من تحت وحدة subunit واحدة) ولا تحوي الكثير من التذيلات السكرية.

ميزات الخمائر وأسباب استعمالها للتعبير الجيني :

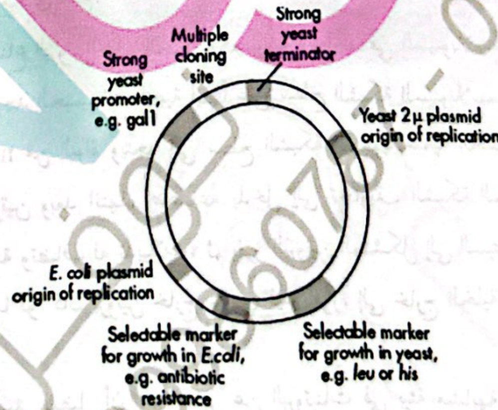
- سهولة زرعها وتنميتها، وصولاً إلى كثافة عالية للخلايا.
- غير معرضة للبشر.
- سهولة تعديلها وراثياً على عكس خلايا الثدييات التي يكون تعديلها أصعب.
- تفرز جزء كبير من البروتينات إلى الوسط الخارجي (لوجود جهاز غولجي)، إذ يكفي القيام بعملية تثفيل أو ترقيد لنحصل على طور طافي غني بالبروتين (يصار إلى تنقيته لاحقاً).

أهم النواقل المستعملة للتعبير في خميرة الجعة

تحوي الخمائر بشكل طبيعي الناقل 2μ plasmid، وهو ناقل يتصف بعدد قليل من النسخ low copy number، لذا تم إجراء كثير من التعديلات عليه ونتج عن ذلك نواقل صنعية ذات كفاءة عالية Yeast Episomal Plasmids (YEPs) انظر الشكل 6-9.

تحوي هذه النواقل العناصر الآتية:

1- محرض قوي للتعبير في الخميرة strong yeast promoter: مثال محرض الـ Gal-promotor، يتحكم بالمورثات المسؤولة عن استقلاب الغالاكتوز، فلو تم وضع الخمائر في وسط خالٍ من الغلوكوز ويحوي على الغالاكتوز، يتم تفعيل هذا المحرض لتبدأ الخميرة باستهلاك الغالاكتوز.



الشكل 6-9: البنية العامة للنواقل الصنعية المستعملة للتعبير الجيني في خلايا الخميرة.

2- موقع إدخال المورثات multiple cloning site: يحوي عدداً كبيراً من تسلسلات التعريف لإنزيمات الاقتطاع.

3- نقطة بدء التضاعف 2μ origin of replication: وهي منشأ بدء التضاعف عند خلايا خميرة الجعة. ويكون أي ناقل يحوي هذه المنطقة قابلاً للتضاعف داخل الخمائر.

4- نقطة بدء التضاعف في *E. coli*: أي ناقل يحوي هذه المنطقة يكون قابلاً للتضاعف داخل *E. coli*.

5- واصمات انتقائية خاصة بالخمائر selective markers for growth in yeast ترمز مثلاً تصنيع حمض أميني ما مثل لوسين leu أو هيستيدين his.

6- واصمات انتقائية خاصة بجراثيم *E. coli*: ترمز غالباً مقاومة لأحد الصادات الحيوية antibiotic resistance.

وتتميز هذه النواقل بأنها نواقل مكوكية، أي يمكنها أن تدخل على خلايا الخمائر وجراثيم *E. coli*، حيث يقوم العلماء بإجراء التعديلات الوراثية والتنسيل cloning في جراثيم الـ *E. coli*، ثم عند تصنيع البروتين الهدف يدخل الناقل إلى خلايا الخميرة لكي يتم التعبير الجيني فيها.

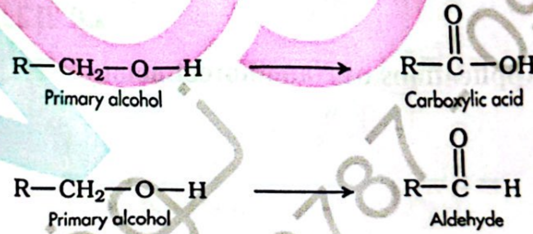
السلالات المستعملة:

تستعمل بشكل شائع السلالات الآتية: *S. cerevisiae* أو *Pichia pastoris*، وتتمتع السلالة الأخيرة بميزات أخرى إضافية:

1- تحقق كثافة خلوية عالية وبالتالي مردود أكبر وتكلفة أقل.

2- تفرز البروتينات بتراكيز عالية إلى الوسط الخارجي.

3- تمتلك محرض قوي قابل للتنظيم وهو (alcohol oxidase gene AOX1) الذي يفعل المورثات المسؤولة عن أكسدة الكحول (الشكل 6-10)، إذ يمكن تحريضه بإضافة القليل من الميتانول إلى الوسط الزرعي.



الشكل 6-10: تفاعلات الأكسدة التي يشرف عليها محرض AOX1 في خلايا الخميرة.

الباب السابع

التقانة الحيوية النانوية

Nanobiotechnology

- **الفصل الأول**

بعض البنى النانوية الموجودة في الطبيعة

Natural biological assemblies at nano-scale

- **الفصل الثاني**

تطبيقات تقانة النانو

Applications of Nanobiotechnology

مقدمة

تعد تقانة النانو Nanotechnology علم حديث يهتم بابتكار تطبيقات تقنية باستعمال أنظمة دقيقة أبعادها من رتبة النانومتر (10^{-9}م) أصغر من الخلايا الحية التي تكون أبعادها من رتبة الميكرومتر. تتكون الأنظمة النانوية من عناصر عضوية (حيوية) أو لا عضوية (معدنية) ووفقاً لذلك تخصصت التقانة النانوية في اتجاهين أساسين هما:

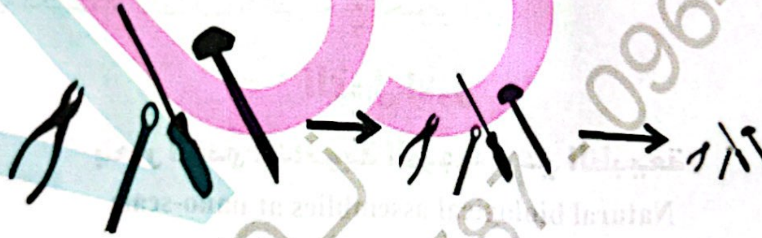
1- Bionanotechnology: يستعمل عناصر بيولوجية المنشأ لبناء أنظمة نانوية تستعمل في تطبيقات حيوية أو غير حيوية (هندسية مثلاً).

2- Nanobiotechnology: يستعمل عناصر بيولوجية أو غير بيولوجية المنشأ لبناء أنظمة نانوية تستعمل خصوصاً في تطبيقات حيوية.

أحدث ابتكار الأنظمة النانوية ثورة حقيقية في المجالات التقنية المختلفة، حيث أمكن بوساطتها إجراء عمليات في منتهى الدقة من مثل: إجراء تحليل نوعي وكمي لعينات في منتهى الصغر، أو إمكانية إيصال الدواء بشكل نوعي إلى داخل الخلية أو حتى إلى أحد مكونات الخلية بشكل عالي الدقة (إلى الجسيمات الكوندرية أو مجين الخلية مثلاً).

وأياً تكن بنية الأنظمة النانوية فإن تشكيلها وبناءها يعتمد على مبدأين أساسيين هما:

1- miniaturization: ويقصد به استعمال أدوات مرئية لبناء طاقم أدوات أصغر منها بكثير (عشر مرات مثلاً)، ثم استعمال هذه الأدوات الصغيرة لبناء أدوات أصغر بكثير، هكذا حتى الوصول إلى أدوات أو أنظمة في منتهى الدقة (رتبة النانو) (الشكل 7-1)، وتجدر الإشارة إلى أن هذه الطريقة صعبة التطبيق عملياً.



الشكل 7-1: مبدأ miniaturization في بناء الأنظمة النانوية.

2- التجميع الذاتي self assembly: مبدأ يتم بوساطته تركيب الأنظمة النانوية الموجودة في الطبيعة، إذ إن البروتينات تشكل أحجار البناء التي تتكون منها البنى النانوية الحيوية، حيث تتحد وحدات عدة من بروتين معين مع بعضها لتكون معقداً متجانس الوحدات multimer، ويمكن أن تضاف إليه وحدات من بروتينات أخرى من طبيعة مغايرة فيتشكل معقد غير متجانس hetero multimer، ومن ثم يمكن أن يتحد هذا المعقد مع معقدات أخرى ليعطوا بنية هندسية منتظمة، كل ذلك يحدث بطريقة ذاتية حتى الوصول إلى جهاز نانوي ذي شكل محدد يقوم بوظيفة محددة (الشكل 7-2).



الشكل 7-2: مبدأ التجميع الذاتي في بناء الأنظمة النانوية.

ويحدث ارتباط الوحدات البروتينية بشكل ذاتي ومن دون الحاجة إلى قوالب مسبقة، حيث تتعرف هذه الوحدات على بعضها بعضاً في محلولها وفقاً لمبدأ التعرف الجزيئي molecular recognition ويحدث ذلك من خلال الإتمام الكيميائي (تفاعل بين مجموعات كيميائية محددة موجودة على أسطح الجزيئات) أو الإتمام الفراغي (مبدأ القفل والمفتاح).

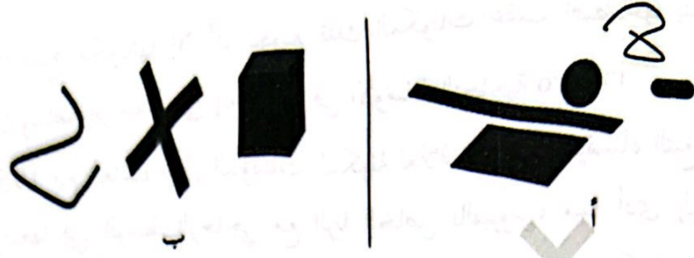
تكون الروابط المتشكلة بين الوحدات غالباً غير تشاركية (قوى فاندرفالس، القوى الكارهة للماء، تجاذبات كهرطيسية، روابط هدروجينية) ومن الممكن أن توجد روابط تشاركية في بنية المعقد وخصوصاً الجسور ثنائية الكبريت أو الرابطة الببتيدية التي تجمع الحموض الأمينية.

الفصل الأول

بعض البنى النانوية الموجودة في الطبيعة

Natural biological assemblies at nano-scale

يعرف علم بيولوجيا البنية structure biology بأنه العلم الذي يدرس هيكلية (بنية) الجزيئات الحيوية كالببتيدات والدنا. وقد لاحظ العلماء في هذا المجال أن الببتيدات يمكن أن تأخذ في الطبيعة أشكالاً فراغية عدة (أنابيب مجوّفة أو مصمتة، خيوط حلزونية، كرات مجوّفة أو مصمتة، صفائح) (الشكل 7-3-أ)، ويمكن أن تأخذ جزيئات الدنا أشكالا مختلفة (خيوط، حلزونات، بنى مستوية متصالبة، وفي شروط خاصة بنى مكعبة) (الشكل 7-3- ب)، وتعد هذه الأشكال الفراغية المتنوعة بمنزلة أحجار لبناء الأنظمة النانوية.

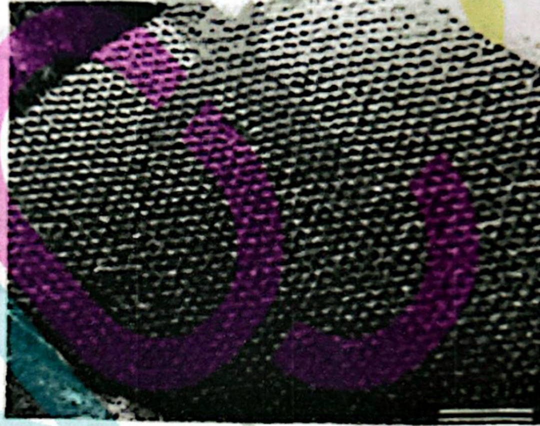


الشكل 7-3: أ: أشكال جزيئات الببتيدات، ب: أشكال جزيئات الدنا.

ونورد فيما يأتي بعض أهم البنى الحيوية النانوية الموجودة في الطبيعة وكيفية الاستفادة منها:

أولاً- الطبقات السطحية لبعض الجراثيم البدائية : Bacterial-S-layer

وهي عبارة عن بُنى ثنائية البعد مُؤلفة من وحدات بروتينية عدة (تكرار للبروتين ذاته أو لمعقد بروتيني) لها ذيول سكرية مُتحدة لتعطي طبقة وحيدة سماكتها 5-15 نانومتر على شكل غلاف يغطي أسطح بعض الجراثيم البدائية archae bacteria (الشكل 7-4)، ويعمل هذا الغلاف السطحي على حماية هذه الجراثيم من تأثير الشروط البيئية القاسية، ويمكنها من العيش في بيئات صعبة، حيث وجدت هذه الجراثيم في ينابيع المياه الحارة أو الكبريتية وفي المياه عالية الملوحة (البحر الميت).



الشكل 7-4: Bacterial-S-layers.

استعمالها :

يستفاد من الجراثيم الحاوية على الطبقات السطحية S-layer في تطبيقات تحتاج إلى شروط صعبة، مثلا الحصول على نواتج استقلابية محددة بوساطة تقنية التخمير في شروط صعبة لباقي الكائنات الدقيقة.

تثبيت immobilization جزيئات الدنا (مسابر) على شرائح معدنية أو بلاستيكية لاستعمالها في الكشف المخبري بوساطة التهجين hybridization، حيث يمكن تحميل جزيئات الدنا على طبقة -S layerومن ثم تثبيتها على السطح المطلوب بالضغط الميكانيكي (طباعة مجهرية دقيقة).

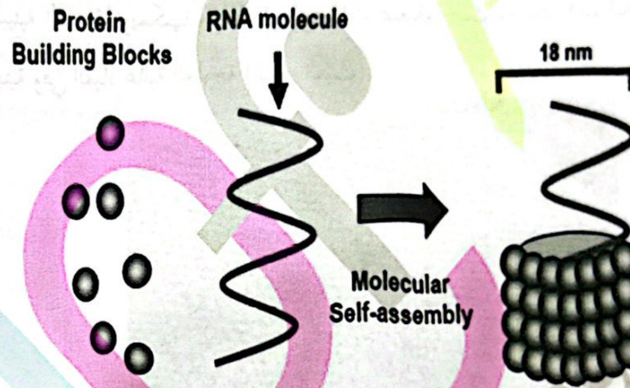
ثانياً- التجميع الذاتي للفيروسات Self assembling of viruses :

تتكون أغلفة البروتينات من طبقة أو أكثر من بروتينات عدة تحيط بالمادة الوراثية للفيروس والتي قد تكون طاق أحادي أو ثنائي من الحمض النووي (دنا أو رنا). وعلى الرغم من حاجة الفيروسات إلى خلية حية

(عائل) من أجل اصطناع مكوناتها إلا أن تجميع تلك المكونات عقب اصطناعها يتم بشكل ذاتي self assembly من دون وساطة إنزيمية، حتى إنه ممكن في الأوساط الزجاجية in vitro.

في العام 1957 قام العلماء بعزل البروتينات المكونة لغلاف فيروس فسيفساء التبغ tobacco mosaic virus (TMV) ووضعها في الوسط الزجاجي مع الرنا الخاص بالفيروس، مما أدى إلى تشكل فيروسات فسيفساء التبغ الوظيفية وكان هذا دليلاً على التجميع الذاتي للفيروسات. حيث يكون غلاف فيروس TMV بشكل أسطوانة مجوفة يبلغ طولها 300 نانومتر وقطرها 20 نانومتر مكونة من تكرار لـ 2000 وحدة بروتينية متماثلة.

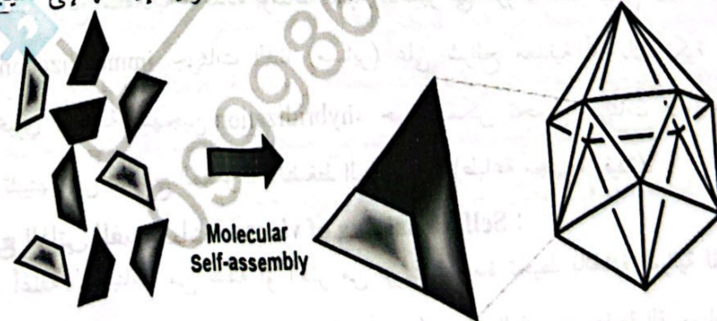
وفسرت آلية التجميع الذاتي كالآتي: يملك أحد طرفي طاق الرنا ألفة تجاه الوحدات البروتينية المكونة لغلاف الفيروس، في البداية تنجذب وحدتان بروتينيتان تجاه طرف طاق الرنا الفيروسي وتتوضعان عليه، يلي ذلك تراصف متتالٍ لعدد كبير من الوحدات البروتينية على طول الرنا مؤدياً إلى تشكل الغلاف الأسطواني للفيروس كما في الشكل 7-5.



الشكل 7-5: آلية التجميع الذاتي لفيروس فسيفساء التبغ.

بطريقة مشابهة يتم التجميع الذاتي لآكلات الجراثيم والتي يكون غلافها موشوري متعدد السطوح، ويتكون كل سطح من ثلاث بروتينات مختلفة لها ألفة تجاه بعضها بعضاً، إذ ترتبط هذه البروتينات بروابط هيدروجينية مؤدية إلى تشكيل غلاف الفيروس الذي يحيط بالحمض النووي للفيروس.

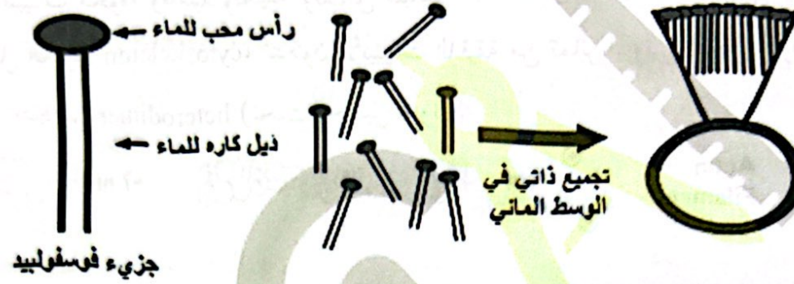
يمكن الاستفادة من ظاهرة التجميع الذاتي لأغلفة الفيروسات في صناعة هياكل الآلات النانوية nano machine أو تحضير جسيمات نانوية (فيروسات صنعية) محملة بمادة دوائية لإيصالها إلى نسيج محدد.



الشكل 7-6: آلية التجميع الذاتي لآكلات الجراثيم.

ثالثاً- التشكّل الذاتي للأغشية الفوسفوليبيدية

تتكون الأغشية الحية (الغشاء السيتوبلاسمي والغشاء النووي) من طبقة ثنائية من الفوسفولبيدات lipid bilayer، ويتكون جزيء الفوسفوليبيد من رأس محب للماء هو الغليسيرين استبدل أحد هيدروكسيلاته بزمرة فوسفات يرتبط بها مركب محب للماء مثل الكولين، ومن ذيل كاره للماء (حمضين دسمين). تحت تأثير القوى الكارهة للماء تصطف جزيئات الفوسفوليبيد في الوسط المائي بشكل ذاتي لتشكل ليبوزوم وحيد أو ثنائي الطبقة (lipid bilayer) كما في الشكل 7-7.



الشكل 7-7: التجمع الذاتي لجزيئات الفوسفوليبيد لتشكيل الليبوزوم.

عند استبدال حلقة سكرية بالغليسيرين في جزيء الفوسفوليبيد كما هي الحال في مركب غلوكوبيرانوزيل أميد (الشكل 7-8) تميل هذه الجزيئات للتجمع مع بعضها لإعطاء بنية اسطوانية مجوفة بدلاً من الشكل الكروي لنحصل على أنبوب ليبيدي نانوي lipid nanotubes بدلاً من الليبوزوم.



الشكل 7-8: التجمع الذاتي لجزيئات الغلوكوبيرانوزيل أميد لتشكيل أنبوب نانوي ليبيدي.

رابعاً- الهياكل الخلوية الليفية fibril cytoskeleton assemblies

وهي عبارة عن شبكة معقدة من الخيوط والأنيبيات الدقيقة الموجودة داخل الخلية ووظيفتها تأمين الدعم الفيزيائي للخلية لتحافظ على شكلها الفراغي، وتشارك أيضاً في حركة الخلية كما في حالة الأهداب والسياط.

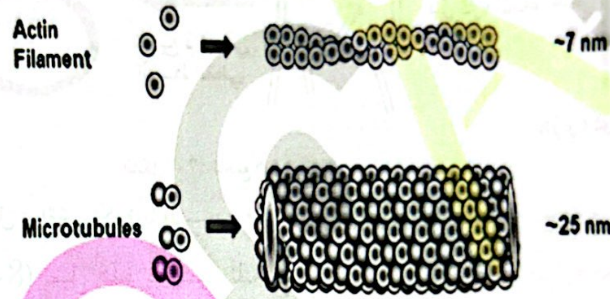
يوجد نوعان رئيسان من هذه البنى الهيكلية هما:

1- ألياف الأكتين Actin filament

توجد ألياف الأكتين في جميع الخلايا وتغزر في العضلات الهيكلية، ويتكون ليف الأكتين من اتحاد خيطين ملتفين على بعضهما بشكل حلزوني، كل خيط منهما هو عبارة عن متماثر سلسلي لبروتين الأكتين. ينتج عن التفاف الخيطين على بعضهما حلزون مضاعف قطره 7 نانومتر، تجدل هذه الحلزونات مع بعضها لتشكل حزم bundles في الخلايا العضلية، أو تنتشر في أرجاء الخلية داعمة الهيكل الخلوي (الشكل 7–9).

2- الأنيبيبات الدقيقة Microtubules

وهي أنيبيبات مجوفة وقاسية وثخينة وتشكل شبكة كثيفة ضمن الخلية لتكون مع ألياف الأكتين ما يعرف بالهيكل الخلوي cytoskeleton، تتكون الأنيبيبات الدقيقة من تماثر لبروتين التوبولين وهو بروتين ثنائي الوحدات غير متجانس heterodimer (تحت وحدتين α وβ).



الشكل 7–9: بنية ألياف الأكتين والأنيبيبات الدقيقة.

بالإضافة إلى وظيفتها البنيوية تعمل الأنيبيبات الدقيقة بمنزلة شبكة تؤمن نقل المكونات المختلفة ضمن الخلية، حيث يتحرك على طول هذه الشبكة نوعان من المحركات الحيوية باتجاهين مختلفين: حيث يتحرك بروتين الـ Kinesin من مركز الخلية نحو خارجها، في حين يتحرك بروتين الـ Dynein من خارج الخلية نحو داخلها.

تطبيقات الألياف والأنيبيبات الدقيقة:

يستعمل هذان النوعان من البنى في بناء الأنظمة النانوية أو كقالب صب للحصول على أسلاك معدنية من رتبة النانومتر من خلال ترسيب المعدن على أسطحها أو في لمعتها ثم التخلص من البروتينات بتفكيكها والإبقاء على السلك المعدني (كما سيرد لاحقاً).

خامساً- لييفات الأميلوئيد Amyloid fibrils

عبارة عن ألياف ذات بنية صمّاء (غير مجوّفة) مكونة من وحدات بروتينية عدة، تتميز عن ألياف الأكتين بأنها قاسية وصلبة مثل الإبر، يبلغ طول أحدها 2–3 ميكرومتر وقطره 10 نانومتر.

تتشكل في حالات مرضية معينة بدءاً من طليعة البيتا أميلوئيد، مثال: لاحظ العلماء وجود هذه اللييفات الصلبة القاسية في النسيج العصبي لكل من مرضى الزهايمر وجنون البقر مما يسبب تخرب الأنسجة العصبية، وسجل كذلك وجودها عند مرضى السكري.

تمتلك لييفات الأميلوئيد بعض الأدوار الفيزيولوجية:

1- تشارك في تشكيل الفيلم الحيوي biofilm في مستنبتات الإشريكية القولونية: تنمو الجراثيم على شكل خلايا مفردة أو على شكل مستعمرات في الأوساط الزرعية، أمّا في الطبيعة فتنمو على السطوح مكونة غشاء رقيقاً يدعى الفيلم الحيوي biofilm، وهو ناتج عن نمو المستعمرات على السطح واتصالها مع بعضها مكونة طبقة رقيقة مستمرة، حيث تلعب لييفات الأميلوئيد دوراً كبيراً في ربط المستعمرات مع بعضها ومع السطح لإعطاء الفيلم الحيوي.

2- تشارك في تشكيل التغضنات عند جراثيم *Streptomyces* : تنمو مستعمرات هذه الجراثيم وتتصل مع بعضها بعضاً لتشكل تغضنات، تلعب لييفات الأميلوئيد دوراً كبيراً في تشكلها ودعم بنيتها.

تطبيقاتها: تستعمل لييفات الأميلوئيد بشكل مشابه لألياف الأكتين والأنيبيبات الدقيقة كقوالب لصب أسلاك معدنية من رتبة النانو من خلال ترسيب المعادن على أسطحها.

سابعاً- القنوات الناقلة Transport channels

تتكون القنوات الناقلة من معقدات بروتينية ضخمة متعددة الوحدات (غالباً غير متجانسة الوحدات hetero multimer) وظيفتها النقل الفعال والاصطفائي للمواد أو الشوارد عبر غشاء الخلية.

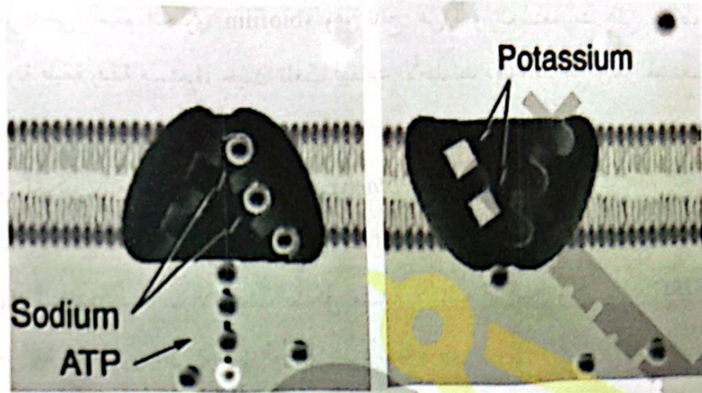
تتصف القنوات الناقلة بأنها ذاتية التجميع فبعد ترجمة البروتينات المكونة لها في سيتوبلاسما الخلية بشكل إفرادي تمتلك هذه البروتينات ألفة لغشاء الخلية ولبعضها بعضاً حيث تبدأ بالانغراس في الغشاء السيتوبلاسمي والارتباط مع بعضها لتكوين القناة الناقلة.

آلية عملها:

تقوم القنوات الناقلة بعملها وفقاً لآلية النقل الفعال، أي يتطلب ذلك طاقة تحصل عليها من قدرتها على حلمهة جزيئات الـ ATP ولتوضيح مبدأ عملها نأخذ مضخة الصوديوم/بوتاسيوم التي تضخ باستمرار شوارد الصوديوم إلى خارج الخلية وشوارد البوتاسيوم إلى داخل الخلية وفق المراحل الآتية (الشكل 7-12):

- تملك المضخة على سطحها الداخلي نوعين من المواقع الفعالة (جيوب) أحدهما قادر على ربط شوارد الصوديوم في حين أن النوع الآخر مخصص لربط شوارد البوتاسيوم.
- في البداية تكون الأسطح الفعالة متجهة نحو داخل الخلية، فترتبط شوارد الصوديوم على الجيوب الخاصة بها في حين تبقى جيوب البوتاسيوم فارغة.
- ترتبط جزيئة ATP على الموضع الرابط لها في القناة وتقوم بروتينات القناة بشطر الـ ATP ويتحرر ADP، ينتج عن هذا التفاعل طاقة تؤدي إلى تغيير شكل أسطح القناة بحيث تصبح نحو الخارج.
- تتحرر شوارد الصوديوم لأن تركيزها في الوسط المحيط أخفض وترتبط شوارد البوتاسيوم الموجودة خارج الخلية على الجيوب الخاصة بها.
- وبمجرد ارتباط البوتاسيوم تنفصل ذرة الفوسفات عن المضخة وتستعيد المضخة شكلها الأساسي أي تعود السطوح نحو داخل الخلية، محررة شوارد البوتاسيوم.

تتكرر هذه العملية باستمرار، طالما توفرت جزيئات الـ ATP في الخلية وشوارد الصوديوم والبوتاسيوم على كلا الطرفين.



الشكل 7–12: بنية وآلية عمل مضخة الصوديوم/بوتاسيوم.

الفصل الثاني
تطبيقات تقانة النانو
Applications of Nanobiotechnology

حققت تقانة النانو نجاحات كبيرة في مجالات عدة:

- في الطب والصيدلة: طرق إيتاء حديثة للدواء، أدوات نانوية للتشخيص المخبري والتصوير الإشعاعي لأعضاء الجسم.
- في الصناعات التجميلية.
- في الزراعة وتقنيات المياه.
- في الأجهزة الالكترونية والأدوات الطبية وغيرها.

سنتحدث في هذا الفصل عن بعض تطبيقات تقانة النانو ولاسيما الطبية والدوائية:

1- تقديم الدواء على شكل حاويات نانوية Nano containers

قد يكون الدواء المعطى في بعض الحالات حساس ويخرب بفعل إنزيمات الجسم قبل وصوله إلى موقع التأثير، أو قد يكون الدواء شديد السمية (كما هي الحال مع العلاجات الكيميائية للسرطان) ويراد إيصاله إلى النسيج أو الخلايا المستهدفة من دون التأثير على الخلايا السليمة، في كلتا الحالتين يكون من المفيد جداً تعبئة المادة الدوائية في حاويات نانوية nano container توصلها إلى مكان التأثير المطلوب.

يمكن أن تصنع الحاويات أو المحافظ النانوية من مواد لا عضوية (معادن) أو من مواد عضوية مثل البروتينات (أغلفة الفيروسات) أو الفوسفوليبيدات (ليبوزومات).

الليبوزومات

يتألف غلاف الليبوزوم من غشاء مضاعف من الفوسفوليبيدات (يشبه الأغشية الخلوية) يحيط الغلاف بتجويف يحوي بداخله المادة العلاجية (الشكل 7-13) . يمكن أن تثبت على غشاء الليبوزوم بروابط غير تشاركية جزيئات تعارف molecules recognition (مثل الأضداد)، تساعد جزيئات التعارف في توجيه الليبوزوم نحو نسيج أو عضو محدد من الجسم. عند وصول الليبوزوم إلى خلايا النسيج المستهدف يندمج غلافه مع غشاء الخلية نتيجة للتشابه في تركيبهما محرراً محتواه داخل الخلية.

هناك تنوع كبير في المواد التي يمكن لليبوزوم أن يحملها: مواد فعالة دوائياً، مواد تجميلية كالفيتامينات (Q10)، مواد قاتلة للخلايا مثل الأدوية الكيميائية للسرطان chemotherapy، أو حتى حموض نووية (دنا أو رنا) في حالة المعالجة الجينية gene therapy.



الشكل 7-13: بنية الليبوزوم.

تتمتع الليبوزومات بميزات عدة:

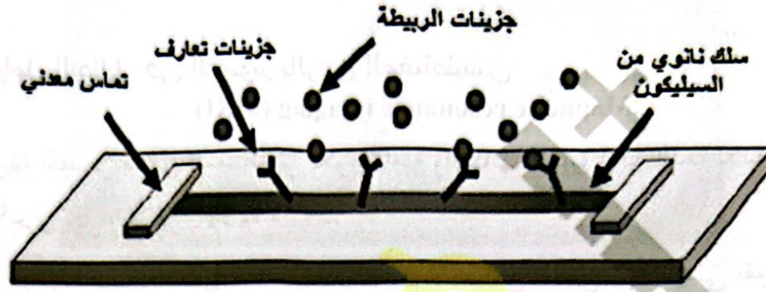
- تؤمن حفظ المادة الدوائية وثباتها لاسيما المواد الحساسة، إذ تكون محاطة بغلاف يحميها من تأثير العوامل الخارجية.
- تكون الليبوزومات ذات توافقية حيوية biocompatibility عالية نظراً لبنيتها المشابهة لأغشية الخلايا الحية، لذلك نادراً ما تحرض رد فعل مناعي أو تحسسي.
- تتمتع باصطفائية عالية وذلك لإمكانية احتوائها على جزيئات تعارف.
- تكون الآثار الجانبية والسمية الناتجة عنها أقل وذلك لأنها تؤمن وصول المادة الدوائية إلى نسيج محدد وتبقى باقي نسج الجسم بمنأى عن الآثار الجانبية للمواد الدوائية.
- تؤمن الليبوزومات توافراً حيوياً أفضل نظراً لسهولة امتصاصها وتوزعها.

2- مصفوفات الأسلاك النانوية Nanowire Array

تستعمل مصفوفات الأسلاك النانوية للتحري عن وجود عامل ممرض معين في عينة ما. وتتكون مصفوفات الأسلاك النانوية من شريحة مصنوعة من مادة خاملة وغير ناقلة، ثبتت عليها أسلاك نانوية مصنوعة من معدن خامل (فضة، ذهب، بلاتين)، ثبتت immobilized على سطح السلك أجسام مضادة عالية الاصطفائية للعامل الممرض المراد التحري عنه (الشكل 7-14).

توضع قطرات من العينة المفحوصة على سطح المصفوفة، فعند وجود العامل الممرض أو مستضداته ترتبط مع الأضداد المثبتة على الأسلاك النانوية، يؤدي هذا الارتباط إلى تغير في ناقلية السلك (إما بالزيادة أو

النقصان تبعاً لشحنة المستضد) ينتج عن تغير ناقلية السلك تبدل في سطوع السلك الأمر الذي يمكن مشاهدته وقياسه باستعمال المجهر الإلكتروني.



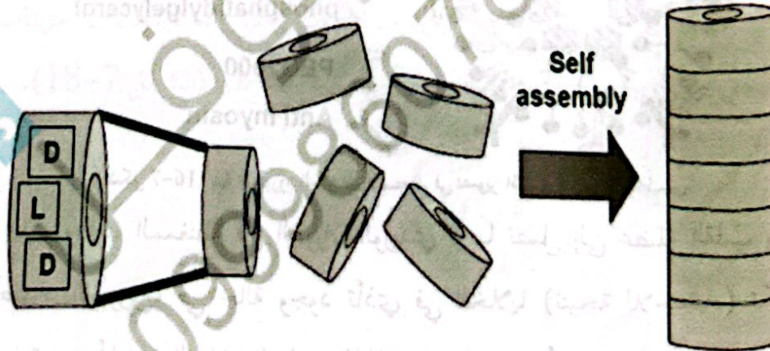
الشكل 7-14: مبدأ عمل مصفوفات الأسلاك النانوية في التحري عن المستضدات.

تتميز مصفوفات الأسلاك النانوية عن طرق الكشف الأخرى بحساسية عالية جداً إذ يكفي ارتباط جزيئة واحدة فقط من المستضد لتتغير ناقلية السلك، الأمر الذي يمكننا من الكشف عن الإصابة بالعامل الممرض فور دخوله إلى الجسم وقبل تكاثره وظهور الأعراض المرضية خلافاً لتقنيات الكشف الأخرى المعتمدة على الأضداد مثل الإليزا ELISA والتي تتطلب وجود العامل الممرض بتركيز أكبر في العينة.

3- إنتاج أنابيب نانوية ببتيدية peptide nano tubes واستعمالها كصادات حيوية.

يؤدي تشكيل سلسلة ببتيدية من حموض أمينية ميمنة وميسرة موزعة بشكل متناوب ....D-L-D-L (أي حمض أميني ميمن ثم آخر ميسر...إلخ) إلى الحصول على بنية ثالثية على شكل حلقة مجوفة. تنجذب حلقات بروتينية عدة إلى بعضها بعضاً بفعل روابط هيدروجينية تتشكل بين أسطحها مما يؤدي إلى تنضدها فوق بعضها بعضاً لتعطي أنابيب نانوية ببتيدية peptide nano tube مجوفة (الشكل 7-15).

يمكن التحكم بقطر الحلقة من الداخل والخارج تبعاً لعدد الحموض الأمينية في كل دورة أو تبعاً لطبيعتها أو ترتيبها.



الشكل 7-15: التشكل الذاتي للأنابيب النانوية الببتيدية.

تعمل هذه الأنابيب المجوفة بمنزلة أقنية ناقلة، ونتيجة لبنيتها الكارهة للماء تنغرس بشكل اصطفائي في الأغشية السيتوبلاسمية للخلايا الحية المستهدفة، مما يؤدي إلى تشكل ثقوب دائمة في هذه الأغشية وانتقال

غير مضبوط للماء والشوارد وباقي المكونات عبر هذه الأغشية مما يتسبب في النهاية بموت الخلايا المستهدفة.

4- إيصال عوامل التظليل في التصوير بالرنين المغناطيسي Magnetic resonance imaging (MRI):

تمتاز طريقة التصوير بالرنين المغناطيسي بكونها آمنة وإعطائها لصورة عالية الدقة ثلاثية الأبعاد مقارنة مع طرق التصوير الأخرى مثل التصوير بالأشعة السينية.

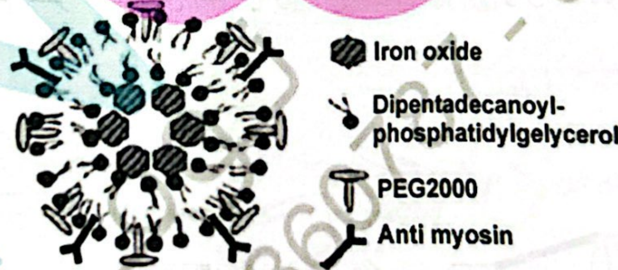
المشكلة الوحيدة في هذه الطريقة أن أنسجة الجسم لا تعكس الحقل المغناطيسي بفوارق كبيرة لذا فهي لا تبدو متباينة بشكل كبير عن بعضها، مما يضطر الأطباء إلى استعمال مواد تظليل contrast agents تتكون غالباً من مركبات الحديد (أملاحه أو أكاسيده) وذلك لتحسين استجابة النسج للحقل المغناطيسي وزيادة القدرة على تمييز الأعضاء والنسج عن بعضها.

ونظراً لسمية مركبات الحديد عند حقنها في مجرى الدم، تشكل تقانة الليبوزومات الممغنطة magneto liposomes حلاً مثالياً لإيصال مركبات الحديد بشكل اصطفائي إلى خلايا العضو الذي نرغب بتصويره.

يوضح الشكل 7-16 بنية الليبوزومات الممغنطة المستعملة عند تصوير عضلة القلب بالرنين المغناطيسي، وتتألف من غشاء مضاعف من الفوسفوليبيدات يحيط بتجويف معبأ بأكسيد الحديد، وثبتت على سطح الغشاء الخارجي لليبوزوم نوعان من الجزيئات هما:

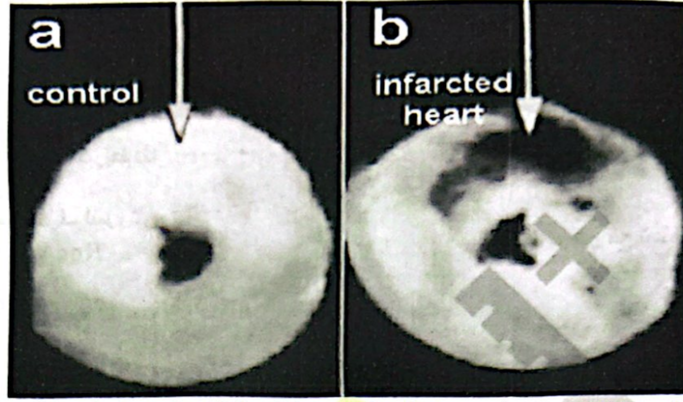
1- بولي إتيلين غليكول PEG2000 لحمايتها من الخلايا البالعة.

2- أضداد الميوزين anti myosin لتوجيه الليبوزومات نحو ألياف عضلة القلب الغنية ببروتين الميوزين.



الشكل 7-16: بنية الليبوزوم الممغنط المستعمل في تصوير القلب بالرنين المغناطيسي.

عند حقن الليبوزومات الممغنطة في الدوران الوريدي فإنها تصل إلى عضلة القلب وتتثبت على أسطح خلاياه بوساطة أضداد الميوزين، في حالة وجود تأذي في الخلايا (نتيجة للاحتشاء) تكون أغشية الخلايا المتضررة أكثر نفوذية من أغشية الخلايا السليمة لذلك فهي تمتص أكسيد الحديد بشكل أكبر وتبدو عند تصويرها بالرنين المغناطيسي بلون عاتم مقارنة مع الخلايا السليمة التي تظهر بلون فاتح (الشكل 7-17).



الشكل 7–17: صورة لذروة القلب بوساطة الرنين المغناطيسي حيث يظهر على اليسار (a) عضلة قلبية سليمة وعلى اليمين (b) عضلة مصابة باحتشاء في المنطقة المشار إليها بسهم.

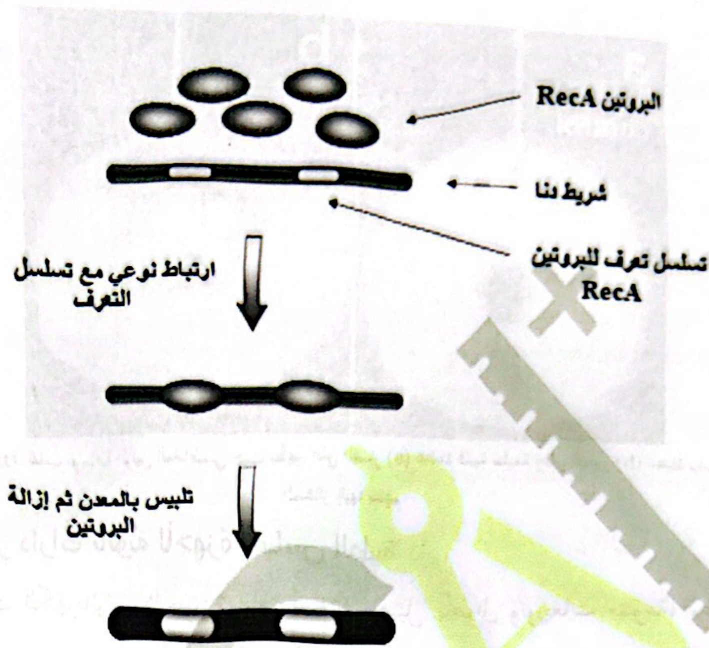
5- صناعة عناصر دارات نانوية لأجهزة القياس الطبية

تضم الدارات الكهربائية والإلكترونية عادة أسلاك توصيل بأطوال وتوزيعات متنوعة، وعند القيام بتصنيع جهاز إلكتروني من رتبة النانو سيلزم بكل تأكيد أسلاك نانوية nano wires لنقل الإشارات الكهربائية، يمكن الحصول على أسلاك نانوية بإحدى طريقتين:

أ- التلبيس الجزئي لحلزون الدنا بالمعادن

يتكون حلزون الدنا من طاقين مفردين ملتفين على بعضهما ليشكلا شريط يبلغ قطره 34 أنغستروم (3,4 نانومتر)، يحوي حلزون الدنا تسلسلات تعريف recognition sequences تربط بشكل اصطفائي بروتينات محددة مثل البروتين RecA.

لصناعة سلك نانوي مكون من منطقتين ناقلتين تفصل بينهما منطقة غير ناقلة نأخذ محلول دنا ونضيف إليه محلول للبروتين RecA ومحلول لشوارد معدن ناقل للتيار (نحاس أو فضة مثلاً)، ترتبط جزيئات البروتين على تسلسلات التعريف الخاصة بها من جزيئات الدنا مؤدية إلى تغطية جزء من حلزون الدنا، ترجع أجزاء الدنا المكشوفة شوارد المعدن (Ag^{+}) مؤدية إلى ترسب ذرات المعدن (Ag) على سطح حلزون الدنا مؤدية إلى تلبيسه بطبقة معدنية ناقلة، يضاف إلى المزيج إنزيمات البروتياز التي تقوم بتفكيك جزيئات البروتين RecA ونشوء منطقة من الحلزون غير ملبسة بالمعدن في مكان تسلسل التعريف (الشكل 7–18).



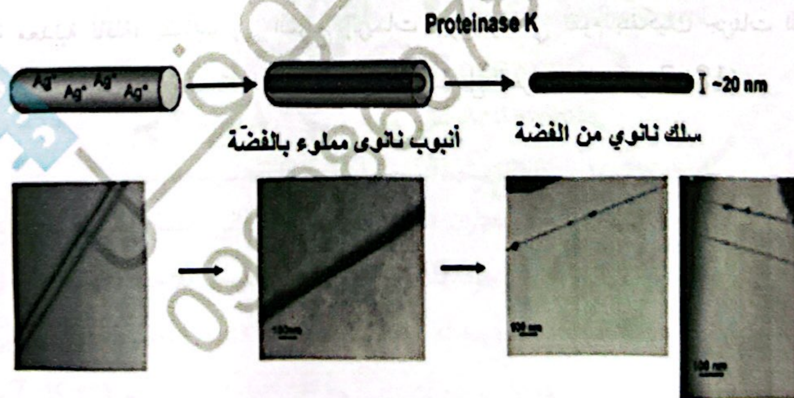
الشكل 7-18: التلبيس الجزئي لحلزون الدنا بالمعدن.

ملاحظة: يطلق مصطلح Bionics على العلم الذي يستعمل الجزيئات الحيوية لبناء عناصر إلكترونية، نحتاً من كل من Bio وElectronics.

ب- ترسيب المعادن في لمعات الأنبيبات الدقيقة

تتصف الأنيبيبات الدقيقة بأن لمعتها الداخلية غنية بالحموض الأمينية ذات الثمالات المرجعة، فعند وضع هذه الأنيبيبات في محلول شوارد معدن ناقل مثل الفضة Ag^{+1} يحدث إرجاع لشوارد المعدن في لمعة الأنيبيب الدقيق مؤدياً إلى ترسب ذرات الفضة Ag مشكلة سلك نانوي مستمر من المعدن الناقل بطول بقطر 20 نانومتر و طول يتجاوز 1 ميكرومتر (الشكل 7-19)

تتم لاحقاً إزالة الغلاف البروتيني للسلك الناقل، أي التخلص من الأنيبيب الدقيق الذي استعمل كقالب صب، من خلال إضافة إنزيم Protease K إلى الوسط.



الشكل 7-19: صناعة الأسلاك النانوية من خلال ترسيب المعدن في لمعة الأنيبيبات الدقيقة.

تطبيقات مستقبلية لتقانة النانو

1- هندسة النسج Tissue engineering :

من المعلوم أن الخلايا الجذعية تستطيع الهجرة من أماكن تواجدها (مكامنها) إلى أماكن حدوث الضرر النسيجي لإصلاحه عندما يتوافر لها دعامة scaffold وإشارات محرضة على النمو والتمايز.

يحاول العلماء إنتاج بنى ذكية smart matrix لإصلاح النسج المتضررة، تؤمن هذه البنى جذب الخلايا الجذعية الجسمية إلى مكان الأذية وإعطائها الإشارات المناسبة للنمو والتكاثر. يتكون أحد التصاميم (الشكل 7-20) من دعامة بوليميرية Polymer scaffold مصنوعة من ألياف بروتينية (كألياف الأكتين)، ثبتت عليها جزيئات من عوامل النمو growth factors.

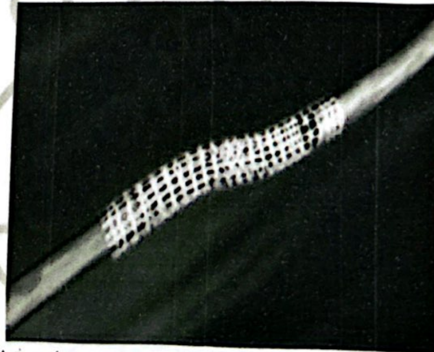
يمكن أيضاً تزويد الدعامة بأجسام مضادة لجذب نوع محدد من الخلايا الجذعية، كما يمكن التحكم بشكل النسيج المتكون من خلال نمط واتجاهات توزيع عوامل النمو على الدعامة.



الشكل 7-20: مخطط يوضح البنية العامة للدعامات البروتينية المستعملة في تنمية الخلايا الجذعية.

مثال: إنتاج نسج غضروفية انطلاقا من خلايا جذعية بمساعدة دعامة بوليميرية Polymeric scaffold وذلك بعد عزل الخلايا الجذعية وتكثيرها على هذه الدعامة بالشكل المطلوب.

يوضح الشكل 7-21 دعامة مصممة لإصلاح الضرر في الأعصاب المتأذية (مثل العصب البصري)، تأخذ الدعامة شكل ضمادة تركب جراحياً (جراحة عصبية مجهرية) حول مكان الضرر وهي مزودة بأضداد لجذب الخلايا الجذعية من النسج المجاورة وعوامل نمو وتمايز لتحريض الخلايا الجذعية على الانقسام والتمايز إلى خلايا عصبية.



الشكل 7-21: مخطط يوضح البنية العامة للدعامات البروتينية المستعملة في تنمية الخلايا الجذعية.

2- إنتاج روبوتات نانوية nano robot لإنجاز العمليات الجراحية الدقيقة

ظل الإنسان يحلم لسنوات طويلة بإنتاج روبوتات بالغة الصغر وإرسالها إلى أماكن في الجسم لا يمكن لأدوات الطبيب الجراح أن تبلغها، لإنجاز عمليات في منتهى الدقة من مثل: إصلاح الأذيات الدماغية، إزالة الانسدادات الوعائية، قتل الخلايا السرطانية أو الدخول إلى نوى الخلايا لإصلاح الأخطاء الجينية.

يمكن من الناحية النظرية باستعمال الأدوات والبنى النانوية التي تم التطرق إليها في هذا الباب بناء مثل هذه الروبوتات، وهناك محاولات كثيرة تجرى في هذا المجال قد تجعل من هذا الحلم حقيقة واقعة في السنوات القليلة القادمة.

الباب الثامن

تقنية مصفوفات الدنا المجهرية

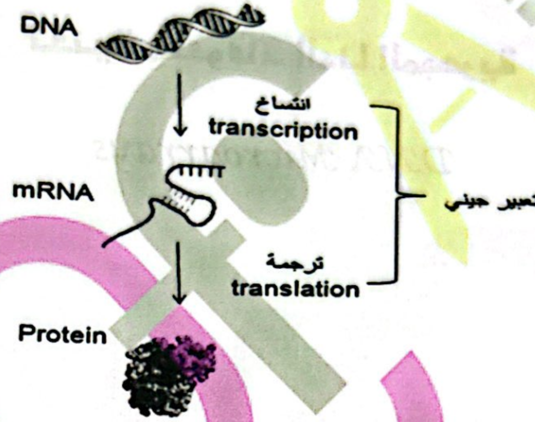
DNA Microarrays

مقدمة

علم وظائف المجين Functional genomics

هو علم يهتم بدراسة التغيرات التي تطرأ على أنماط التعبير الجيني gene expression كماً ونوعاً في أزمنة مختلفة أو نتيجة للتعرض لعوامل خارجية قد تكون طبيعية (تغير شروط الوسط) أو مرضية (كوجود عامل ممرض أو التعرض لمادة سامة).

ومن المعروف أن التعبير الجيني ينقسم إلى مرحلتين (الشكل 8-1): مرحلة الانتساخ transcription وفيها يتم تشكيل نسخة رنا مرسال انطلاقاً من المورثة، أما المرحلة الثانية فهي الترجمة translation وفيها تترجم نسخة الرنا المرسال إلى بروتين وظيفي.



الشكل 8-1: مراحل عملية التعبير الجيني gene expression

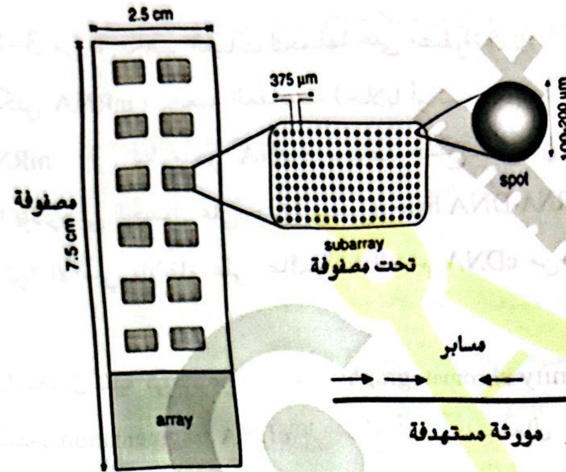
هناك آليات عدة للتحكم بمستوى تعبير مورثة معينةٍ، وتتوزع هذه الآليات على مرحلتي التعبير الجيني (الانتساخ والترجمة) وبذلك فإن كل مورثة يمكن أن يتم رفع مستوى تعبيرها up regulation أو خفضه down regulation أو حتى إيقافه بالكامل switch off.

إن أحد أهم أهداف علم وظائف المجين هي البحث عن المورثات التي يزداد أو ينقص مستوى تعبيرها بتأثير شروط معينةٍ، وقد ساعد التطور الهائل في التقنيات الحيوية والبرمجيات الرقمية في تسهيل عملية تتبع التغييرات الحاصلة في تعبير آلاف من مورثات الكائن الحي في آنٍ gene expression profiling، الأمر الذي كان في الماضي صعباً للغاية، نظراً للكم الهائل من البيانات الناتجة عن مراقبة تغيرات تعبير مورثات الكائن الحي.

دراسة التعبير الجيني باستعمال مصفوفات الدنا

يطلق على هذه التقنية أسماء أخرى من مثل: DNA chip, biochip, gene chip، يوضح الشكل 8-2 بنية مصفوفة الدنا، فهي عبارة عن شريحة صغيرة الحجم بحجم الشريحة المجهرية، مصنوعة من مادة خاملة (زجاج أو سليكون) ومقسمة إلى عدد من المناطق الأصغر، يطلق على كل منها اسم تحت مصفوفة sub array تحوي كل واحدة منها عدداً كبيراً من البقع spots المتوضعة في صفوفٍ وأعمدةٍ، وتمثل كل بقعة منها

إحدى مورثات المجين، إذ إن كل بقعة تحوي مسابر تتمم بشكلٍ نوعيٍ مناطق مختارةً من المورثة المعنية. بما أن المسبار قصير (عديد نكليوتيد) لذلك تحوي البقعة الواحدة خليطاً من مسابر عدةً ترتبط في مناطق متفرقةٍ على طول المورثة.



الشكل 8-2: بنية مصفوفات الدنا.

ولابد من الإشارة هنا إلى أن توزيع المسابر على بقع المصفوفة يتم بوساطة روبوتاتٍ خاصةٍ وبعملية مؤتمتةٍ بالكامل. وفي السابق وقبل تطور هذه الوسائل التقنية كان توزيع المسابر يتم بشكلٍ يدويٍ على شريحة تحوي 96 حفرةً 96-well plate، وكان هذا الشكل من المصفوفات يعرف بـ Macroarray لأنه يمثل عدداً محدوداً من المورثات، بعدد حفر الشريحة.

يتم تثبيت المسابر على سطح الشريحة probes immobilization باستعمال واحدة من التقنيات الثلاث الآتية:

1. الطرق النقطي الخفيف drop touch
2. النفث الكهربائي
3. الطباعة الضوئية الحجرية photolithography

مبدأ عمل مصفوفات الدنا

يعتمد مبدأ عملها على التهجين الحاصل بين المسابر المثبتة على سطح الشريحة وقطع الدنا المتممة لها والموجودة في محلول العينة وفقاً لقاعدة تتام الأسس base pair complementation

تحضير العينات وإجراء الفحص

تقاس شدة التعبير الجيني من خلال تحديد كمية الرنا المرسال mRNA الذي تنتجه المورثة، لكن وبما أن المسابر المثبتة immobilized على سطح المصفوفة طبيعتها DNA (مسابر الدنا أكثر ثباتاً من مسابر

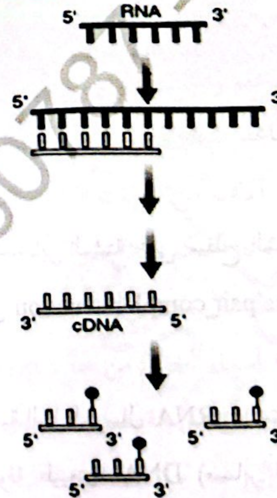
الرنا)، لذا كان من الضروري تحويل الرنا المرسال المستخلص من خلايا العينة إلى دنا متمم cDNA وذلك بوساطة تفاعل النسخ العكسي reverse transcription.

مراحل تحضير العينات

يوضح الشكل 8-3 مراحل تحضير العينات لتحميلها على مصفوفة الدنا:

- يعزل الرنا المرسال الكلي mRNA من العينة المفحوصة (خلايا أو نسيج ما) .
- يتم تحويل الـ mRNA إلى دنا متمم cDNA بوساطة النسخ العكسي باستعمال إنزيم reverse transcriptase مما يؤدي إلى الحصول على حلزون هجينRNA-DNA hybrid .
- يتم تفكيك طاق الرنا الأصلي والإبقاء على طاق الدنا المتمم cDNA من خلال المعالجة بقلوي مثل NaOH.
- ينقى الدنا المتمم باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الألفة affinity chromatography على أعمدة السليكا.
- تتم تجزئة الدنا المتمم cDNA fragmentation إلى قطع أصغر باستعمال إنزيمات الاقتطاع restriction enzymes.
- توسم العينات labeling بملونات متألقة: مثلاً Cy5 ذو التألق الأحمر للعينة المجهولة، و Cy3 ذو التألق الأخضر للعينة الشاهدة.
- تمزج كميتين متساويتين من كل من العينة المجهولة والشاهدة ثم يحمل المزيج على المصفوفة، وتحضن طيلة الليل over night في فرن تهجين hybridization oven في درجة حرارة مقدارها 37ºم ليتم الارتباط بين المسابر في المصفوفة و قطع الدنا في العينة
- تغسل الشريحة لإزالة بقايا الدنا غير المرتبطة .

1. استخلاص RNA
2. تصنيع cDNA
3. تفكيك RNA بوسط قلوي
4. تنقية cDNA على الأعمدة
5. تجزئة cDNA ووسم نهاياته



Legend: RNA DNA

الشكل 8-3: مراحل تحضير العينات ووسمها قبل تحميلها على مصفوفة الدنا.

ملاحظة:

يمكن أن تكون العينتان (المجهولة والشاهدة) من شخصين أحدهما مريض والآخر سليم، أو من الشخص ذاته ولكن من منطقتين مختلفتين (نسيج سليم وآخر مرضي)، أو حتى من النسيج والمنطقة ذاتها لكن في لحظتين زمنيتين مختلفتين وذلك لدراسة الاختلافات في مستوى التعبير الجيني في كل حال.

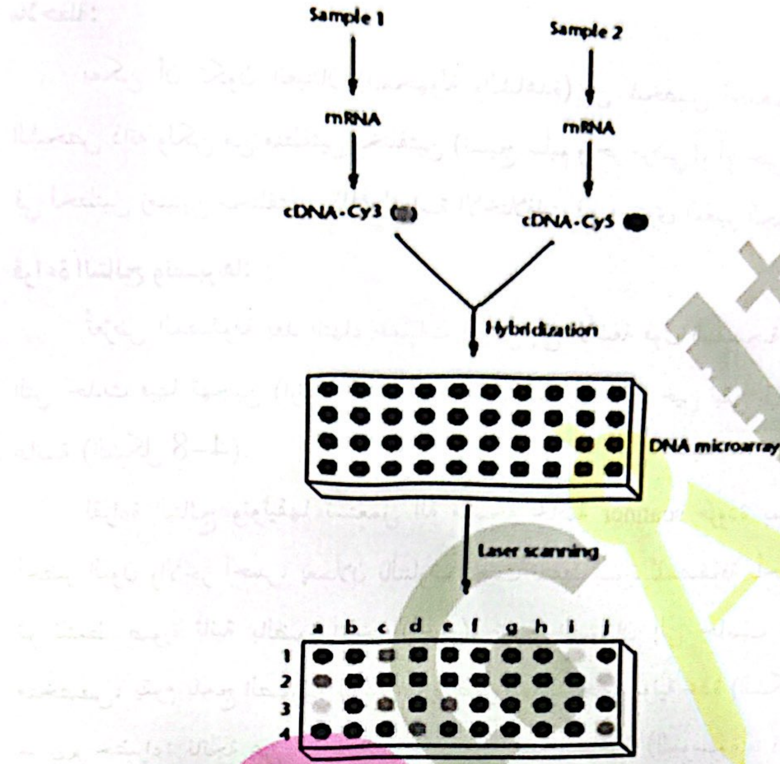
قراءة النتائج وتفسيرها:

تُعرّض المصفوفة بعد انتهاء عمليات الغسل إلى الأشعة فوق البنفسجية UV مما يؤدي إلى تألق البقع التي حدث فيها تهجين (ارتباط الدنا الموسومة بالمسابر) ، في حين تبقى البقع التي لم يحدث فيها تهجين عاتمة (الشكل 8-4).

لقراءة النتائج وتوثيقها تستعمل آلة ماسحة خاصة scanner مزودة بمنبعين ضوئيين ليزريين أحدهما أخضر اللون والآخر أحمر، يعملان بالتناوب بحيث تلتقط صورة للمصفوفة بأحد الضوئين أولاً (الأخضر مثلاً) ثم تلتقط صورة ثانية بالضوء الآخر (أحمر)، ترسل الصورتان إلى حاسب خاص مزود ببرنامج معالجة متخصص، يقوم بدمج الصورتين لتنشأ صورة تظهر فيها تدرجات لونية عدة (الشكل 8-4):

- بقع خضراء: ناتجة عن ارتباط الدنا فقط من العينة الشاهدة (الموسومة بـ Cy3 الأخضر)، أي إن المورثة المدروسة لا يتم التعبير عنها في العينة المجهولة، مما يدل على حدوث إطفاء للمورثة switch off أو تخفيض لمستوى تعبيرها down regulation في عينة المجهول.
- بقع حمراء: ناتجة عن ارتباط الدنا فقط من العينة المجهولة (الموسومة بـ Cy5 الأحمر)، أي إن المورثة المدروسة يتم التعبير عنها فقط في العينة المجهولة، مما يدل على حدوث تفعيل للمورثة switch on أو زيادة لمستوى تعبيرها down regulation في عينة المجهول.
- بقع صفراء: ناتجة عن ارتباط كميات متساوية من الدنا من كلا العينتين، أي إن المورثة المدروسة يتم التعبير عنها بالمقدار ذاته في كل من العينتين الشاهدة والمجهولة.
- بقع سوداء: ناتجة عن عدم ارتباط أي من دنا العينتين الشاهدة والمجهولة، أي إن المورثة المدروسة لا يتم التعبير عنها إطلاقاً في كلا الحالتين.

وتعد تقنية مصفوفات الدنا طريقة نوعية ونصف كمية لقياس مستوى التعبير الجيني، لأن النتائج المنبثقة عنها تشير إلى زيادة أو نقصان التعبير الجيني بشكل تقريبي من دون وجود واحدات قياس، على الرغم من أن بعض البرمجيات المتطورة المستعملة لقراءة النتائج وتفسيرها تعطي نسبة مئوية لزيادة/نقصان مستوى التعبير الجيني اعتماداً على قياس التدرج اللوني بين اللونين الأحمر والأخضر، الشكل 8-5 يوضح بعض التجهيزات الحديثة المستعملة في هذه التقنية.



الشكل 8-4: قراءة وتفسير لون التألق وشدته في تقنية مصفوفات الدنا.



الشكل 8-5: بعض التجهيزات و البرمجيات المستعملة لقراءة وتفسير نتائج مصفوفات الدنا.

تطبيقات تقنية مصفوفات الدنا

يمكن باستعمال مصفوفات الدنا قياس التغيرات الحاصلة في تعبير مختلف مورثات كائنٍ حيٍ، ما مما له تطبيقاتٌ مهمة في المجالات الآتية:

1- دراسة التغيرات المرضية للتعبير الجيني

أي دراسة ما هي المورثات التي يزداد أو ينقص مستوى تعبيرها بالتزامن مع الإصابة بمرضٍ معينٍ. فلتحديد المورثات المسؤولة عن تطور سرطانٍ ما وليكن سرطان الثدي:

نأخذ عينتين من المريضة ذاتها إحداهما من الورم والأخرى من منطقةٍ سليمةٍ غير مصابةٍ بالورم، ويمكن طبعاً المقارنة مع عينةٍ ثالثةٍ لامرأةٍ غير مصابةٍ بسرطان الثدي.

يعزل الرنا المرسال الكلي من العينات المأخوذة، ويتم تحويله إلى دنا متمم cDNA، توسم العينة السليمة بالواسم Cy3 (الأخضر) وتوسم العينة المرضية بالواسم Cy5 (الأحمر)، و تعامل العينتان كما هو مبينٌ في الفقرة السابقة.

بعد تحميل العينات على المصفوفة المجهرية microarray وإجراء عمليات الحضن والغسل المذكورة سابقاً نقوم بقراءة النتائج باستعمال الماسح الليزري ومعالجتها ببرنامجٍ خاصٍ **نلاحظ مايلي:**

- يتوقع أن معظم البقع الضوئية ستكون ذات تدرجٍ أصفرٍ وتعبر عن مورثات لم يكن هناك فارقٌ في تعبيرها بين كلٍ من العينة السليمة والعينة الورمية.
- في حال ظهور بقعٍ خضراء اللون، فهذه تدل على مورثاتٍ حدث فيها تراجعٌ لمستوى التعبير الجيني down regulation في العينة المريضة، ومن المحتمل أن هذا قد أدى إلى تناقص إنتاج بروتيناتٍ مهمةٍ، يلعب غيابها دوراً مهماً في تطور السرطان، مثل المورثات الكابحة للورم tumor suppressor genes.
- في حال ظهور بقعٍ حمراء اللون، فهذه تدل على مورثاتٍ حدث فيها زيادةٌ لمستوى التعبير الجيني up regulation في العينة المريضة، ومن المحتمل أن هذا قد أدى إلى زيادة إنتاج بروتيناتٍ، تلعب دوراً مهماً في تطور السرطان، مثل المورثات المحرضة على انقسام وتكاثر الخلايا proto-oncogenes.

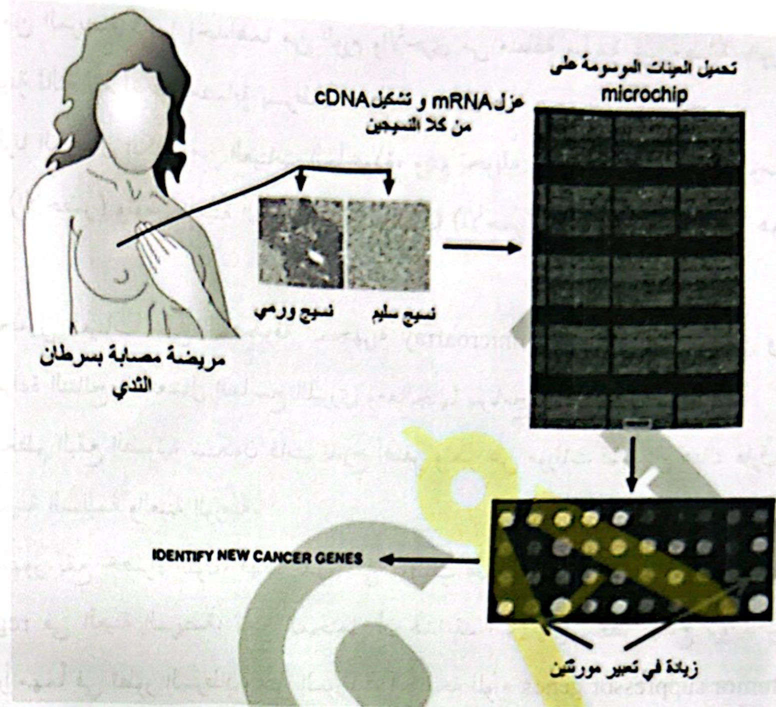
عند معرفة المورثات التي حصل لها زيادةٌ أو نقصانٌ في التعبير الجيني، يمكن البدء باختيار علاجٍ مناسبٍ لهذه الحال، بحيث يتم تعويض البروتينات الناقصة أو تثبيط البروتينات التي حصل لها فرط في الإنتاج.

ويمكن أيضاً استعمال هذه التقنية كوسيلةٍ للتشخيص الباكر لسرطان الثدي (الشكل 8-6)، قبل ظهور الأعراض السريرية، وبالتالي التدخل الباكر قبل تطور المرض وانتشاره، مع ما يتضمنه ذلك من نسب شفاءٍ عاليةٍ للمرض.

2- تشخيص الأخماج باستعمال بصمة التعبير الجيني

عندما يقوم كائنٌ حيٌ دقيقٌ (عاملٌ ممرضٌ) بخمج كائنٍ حيٍ فإنه يسبب تغيراً في نمط التعبير الجيني gene expression profile لهذا الكائن الحي، حيث يزداد تعبير مورثاتٍ محددةٍ بينما ينقص تعبير مورثاتٍ أخرى.

يكون هذا التغيير مميزاً للعامل الممرض طالما أنه يصيب الكائن ذاته وفي الشروط نفسها، ويمكن اعتبار ذلك بمنزلة بصمةٍ مميزةٍ للعامل الممرض واستعمالها في تشخيص الأخماج.



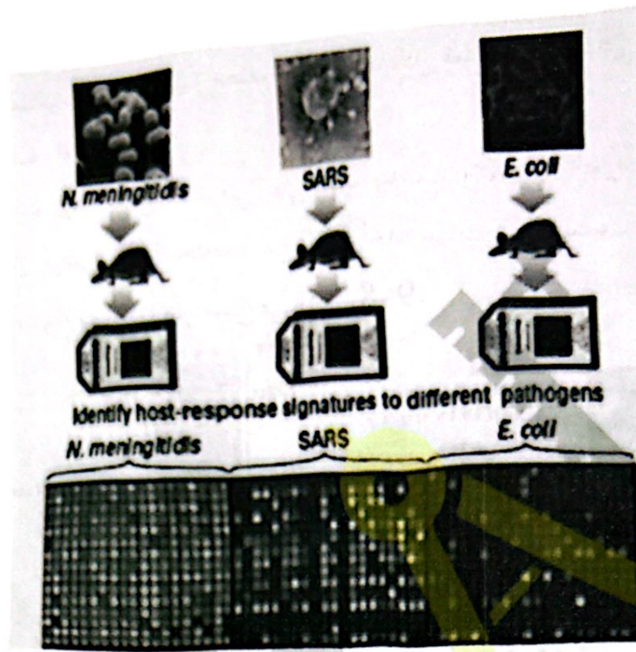
الشكل 8-6: استعمال مصفوفات الدنا لتشخيص المورثات المسؤولة عن الإصابة بسرطان الثدي.

في المثال الموضح في الشكل 8-7 قام العلماء بأخذ ثلاثة فئران من السلالة ذاتها، وخمج كل منها بأحد ثلاثة عوامل ممرضةٍ هي جراثيم الإشريكية القولونية، جراثيم النيسيريا السحائية وفيروس السارس، ثم قاموا بعزل الرنا المرسال من هذه الفئران وتحويله إلى دنا متمم cDNA ثم دراسته باستعمال تقنية مصفوفات الدنا.

لوحظ دائماً أن كل عامل ممرض يؤدي إلى الحصول على توزع مميز للبقع الملونة، تساعد في تمييزه عن باقي العوامل الممرضة الأخرى.

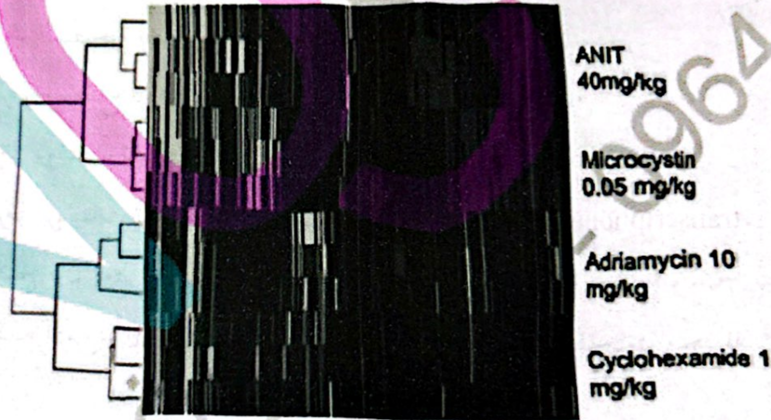
3- دراسة تأثير المواد السامة على تعبير المورثات

تمتلك بعض المركبات الكيميائية سمية للمورثات gene toxic ،إذ يمكن أن تؤدي إلى طفرات في المورثات مسببة تغيراً في بنية البروتينات الناتجة عنها، وفي حالات أخرى قد تحدث الطفرة في المناطق التي تنظم تعبير المورثة (مثل المحرّض promotor)، مما يؤدي إلى زيادة أو نقصان كمية البروتين المنتج دون التأثير على بنيته.



الشكل 8-7: استعمال تقنية مصفوفات الدنا لتشخيص العوامل الممرضة.

من المهم جداً بالنسبة لأي دواءٍ أو عقارٍ مكتشف أن تتم دراسة تأثيره على عمل وتعبير المورثات، قبل أن يتم اعتماده بوصفه علاجاً مرخصاً. وتقدم تقنية مصفوفات الدنا حلاً سريعاً يمكننا من دراسة تأثير أي دواء على عددٍ هائلٍ من المورثات من خلال تجربة واحدة كما هو مبين في الشكل 8-8.



الشكل 8-8: استعمال مصفوفات الدنا لدراسة السمية الجينية لعدد من المواد بجرعات مختلفة. نلاحظ من الشكل اختلاف نمط التعبير الجيني لحيوان التجربة وفقاً لكل مادة من المواد التي أعطيت له.

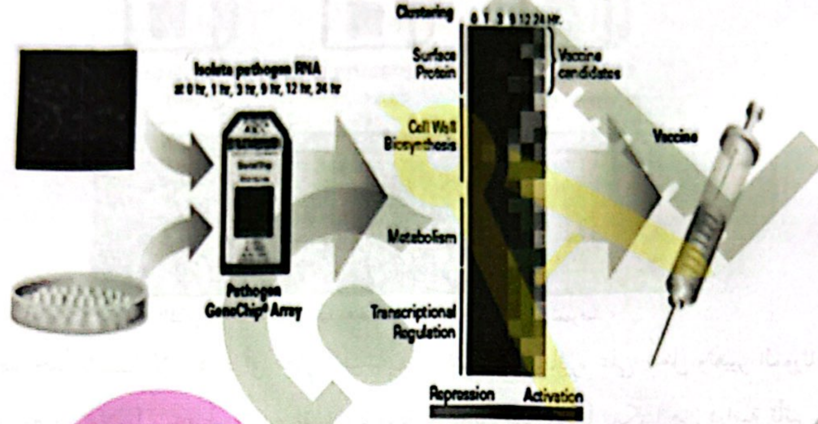
4- تطوير اللقاحات الجديدة

يمكن أن يكون اللقاح عاملاً ممرضاً كاملاً حياً مضعفاً أو مقتولاً، وقد يكون جزءاً من هذا العامل الممرض (محفظته، غشائه، أحد بروتيناته). أياً كان نوع اللقاح فهو يمتلك مستضدات antigens، تحرض الجهاز المناعي للكائن الحي (المناعة الخلطية) وتؤدي إلى استجابةٍ مناعيةٍ تتمثل بإنتاج أضدادٍ نوعيةٍ.

تختلف قدرة اللقاح على إحداث الاستجابة المناعية تبعاً لنوعه، وفي حال اللقاحات الجزئية، التي تمثل جزءاً من العامل الممرض تكمن الصعوبة في معرفة الجزء المناسب والذي يضم المستضدات الأكثر قدرةً على

إحداث الاستجابة المناعية، وتساعد تقنية مصفوفات الدنا بشكلٍ فعالٍ في معرفة أي أجزاء العامل الممرض يصلح أن يستعمل بوصفه لقاحاً فعالاً.

لتحقيق ذلك تتم زراعة العامل الممرض على وسطٍ مناسبٍ وتتم مراقبة التغيرات الحاصلة على تعبير مختلف مورثاته خلال مراحل نموه المختلفة، من خلال أخذ عينات من المستنبت بفواصل زمنيةٍ محددةٍ وتحليلها باستعمال مصفوفة الدنا، كما هو مبينٌ في الشكل 8-9.



الشكل 8-9: استعمال تقنية مصفوفات الدنا في تطوير لقاحات جديدة.

يوضح الشكل تغيرات التعبير الجيني لدى العامل الممرض لكلٍ من:

- مورثات البروتينات السطحية للعامل الممرض surface proteins.
- المورثات التي ترمّز اصطناع بروتينات الجدار الخلوي cell wall proteins.
- المورثات التي ترمّز بروتينات تشارك في العمليات الاستقلابية metabolism proteins.
- المورثات التي ترمّز بروتينات تلعب دوراً في تنظيم الانتساخ transcriptional regulation.

كما هو واضح فإن بعض البروتينات السطحية يزداد مستوى إنتاجها بمرور الوقت- تصبح البقع المعبرة عنها حمراء كلما تقدم الزمن- لذلك تعد هذه البروتينات مؤهلة لاختبارها كلقاحات محتملة.